Infektionsversuche mit Clostridium botulinum Typ B

(Clostridium parabotulinum Typ B – Bengtson 1924)

Martin Kley

1962

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. A. Meyn

INFEKTIONSVERSUCHE MIT CLOSTRIDIUM BOTULINUM TYP B

(Clostridium parabotulinum Typ B - Bengtson 1924)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

Martin Kley
Geislingen / Steige

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. K. U l l r i c h

Referent: Prof. Dr. A. M e y n +

Tag der Promotion: 27. Juli 1962

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

Dem Andenken meines hochverehrten Lehrers

Herrn Professor Dr. A. M e y n

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		
LITERATUR		
A.	Der Botulismus als alimentär bedingte Intoxikation	2
I.	Geschichtliche Einführung	
II.	Ätiologie	2
1.	Bakteriologie von Clostridium botulinum	2
2.	Toxin von Clostridium botulinum	6
III.	Pathogenese Resorption und Wirkungsmechanismus des Botulinustoxins	8
IV.	Symptomatologie des Botulismus	10
1.	Der Botulismus des Menschen	10
2.	Der Botulismus der Tiere	12
B.	Der Botulismus als Infektionskrankheit	14
I.	Infektionsversuche mit Cl. bot.	14
1.	Die Verfütterung und Injektion großer Sporenmengen	14
2.	Infektionsversuche mit kleinen Sporenmengen unter Verwendung gewebeschädigender Substanzen	18
3.	Die Infektion auf alimentärem Wege	19
II.	Die Isolierung von Cl. bot. aus Wunden	20
III.	Manifeste Wundinfektionen beim Menschen	20
EIGENE UNTERSUCHUNGEN		22
A.	Material und Methodik	22
I.	Züchtung des Erregers	22
II.	Sporengewinnung	23
III.	Ermittlung der Sporenzahl/ml	25

Seite

IV. Prüfung der Keimfähigkeit 26
V. Entgiftungsmethoden 28
VI. Versuchstiere, Infektionsmodus und Erregernachweis 29

B. Die Ergebnisse der Infektionsversuche 30

I. Die Prüfung der Entgiftungsmethoden 30

1. Die Entgiftung der Sporenkulturen durch Waschen 31
2. Die Entgiftung der Sporenkulturen durch Erhitzen 35

II. Infektionsversuche mit gewaschenen und erhitzten Sporen von Cl. bot. Typ B, Cl. novyi und Cl. septicum ohne Adjuvans 35

III. Infektionsversuche mit entgifteten Sporen von Cl. bot. Typ B, unter Verwendung kataphylaktischer Substanzen 37

1. Die Schädigung der Muskulatur durch $CaCl_2$-Lösung 37
2. Der kataphylaktische Einfluß von Adrenalin, Na_2CO_3, $CaCl_2$ und steriler Erde 46
3. Der kataphylaktische Einfluß steriler Erde in 3 ‰ iger $CaCl_2$-Lösung 49
4. Der kataphylaktische Einfluß aerober Mischinfizienten 50

IV. Die Infizierung einer künstlich gesetzten Wunde mit entgifteten Sporen von Cl. bot. Typ B 53

C. Besprechung der Ergebnisse 57

D. Zusammenfassung 63

LITERATURVERZEICHNIS 65

Lebenslauf

EINLEITUNG

Im Jahre 1951 wurden in der anglo-amerikanischen Literatur drei durch Wundinfektion verursachte Botulismusfälle beim Menschen beschrieben.

Da in Europa bisher keine Wundinfektionen durch Clostridium botulinum beobachtet wurden und die von amerikanischen und französischen Autoren gemachten Angaben keine Berücksichtigung im deutschen Schrifttum fanden, erhielt ich von Herrn Professor Dr. A. Meyn den Auftrag, dem Problem der botulinogenen Wundinfektion auf experimentellem Wege nachzugehen.

LITERATUR

A. Der Botulismus als alimentär bedingte Intoxikation

I. Geschichtliche Einführung

Im Jahre 1820 beschrieb der Arzt und Dichter Justinus Kerner (1786-1862, 75) zum ersten Male in einer Monographie eine damals nicht selten beim Menschen auftretende Krankheit, die unter charakteristischen nervösen Symptomen häufig tödlich endete. Da als Ursachen der Erkrankungen fast stets schlecht geräucherte oder lange gelagerte Blut- und Leberwürste ermittelt wurden, bezeichnete Kerner die Vergiftung nach dem lateinischen Wort "botulus" = Wurst, als Botulismus.
Wenn auch wirksame Maßnahmen zur Verhütung des Botulismus bekannt waren und von der Obrigkeit gefördert wurden - Kerners Veröffentlichung war der Anlaß, daß in Württemberg die Anzeigepflicht für Wurstvergiftungen eingeführt wurde - so blieb doch die Herkunft und Natur des Giftes jahrzehntelang ungeklärt. Neben verfälschten Gewürzen (Belladonna, Bilsenkraut), unreinen Salzen, giftigen Fettsäuren, Ptomainen, Trichinen wurden von Steller 1853, van den Corput 1855, Wittig 1856 und Kasper 1858 (ref. nach Meyer 1929 (95)) erstmals mikroskopische Pflanzenorganismen verdächtigt, ohne daß sie jedoch ein bakterielles Agens nachweisen konnten.
1895 gelang es van Ermengem (1896, 43) nach einer Massenvergiftung in Ellezelles (Belgien) aus einem rohen Schinken einen Organismus zu isolieren, der die klassischen Henle'schen Postulate erfüllte. Van Ermengem nannte den sporenbildenden anaeroben Keim Bacillus botulinus (1896, 1897, 43).

II. Ätiologie

1. Bakteriologie von Clostridium botulinum

a) Systematische Stellung

Die von van Ermengem 1896 (43) gewählte Benennung Bacillus botulinus wurde von Bengtson 1924 (8) auf Vorschlag des Commitee on Classification der Society of American Bacteriologists 1917 (31) aus morphologischen Gesichtspunkten zugunsten der neuen Bezeichnung Clostridium botulinum aufgegeben. Schon 1897 war es Kempner (73) gelungen, durch wiederholte s.c. Verabreichung minimaler Toxinmengen an eine Ziege, ein wirksames Antitoxin herzustellen. Spätere Toxinneutralisierungsversuche mit den Antiseren der im Laufe der Jahre isolierten Botulinusstämme, führten zur Entdeckung mehrerer, antigenetisch differenter Toxintypen, die medizinisch von großer Bedeutung sind und eine wichtige Grundlage der heute üblichen systematischen Einteilung bilden. Man unterscheidet danach die Typen A, B, C, D und E.
Daneben hat Bengtson 1924 (8) die Verdauung von hitzekoaguliertem Eiweiß zum Kriterium für eine Unterscheidung in eine ovolytische (Parabotulinus-) und eine anovolytische (Botulinus-) Spezies erhoben, die im besonderen der Identifizierung atoxischer Stämme dienen soll.
In Bergeys Manual of Determinative Bacteriology 1957 (10) finden beide obengenannten Einteilungsprinzipien Berücksichtigung. Danach umfassen die Spezies Clostridium botulinum (Holland 1920 (64)) und Clostridium parabotulinum (Bengtson 1924 (8)) mehrere Typen mit spezifischer Toxinbildung.

1.	Clostridium botulinum	(keine Verflüssigung von koaguliertem Hühnereiweiß)
	Toxin-Typ B	hierher gehört der von van Ermengem 1896 (43) isolierte Botulinusstamm, sowie die meisten europäischen Stämme des Typ B
	Typ C α	(Bengtson 1924 (8)) wird nur von homologem Antitoxin neutralisiert
	Typ C β	(Seddon 1922 (124)) wird auch von C α Antitoxin neutralisiert
	Typ D	Meyer und Gunnison 1928 (98)

Typ E	Gunnison, Cummings und Meyer 1936 (55)

2. Clostridium parabotulinum (Bengtson 1924 (8))

Typ A	
Typ B	umfaßt die Mehrzahl der amerikanischen Stämme des Typ B

b) Morphologie und kulturelle Eigenschaften

Cl. botulinum (Cl. bot.) und Cl. parabotulinum (Cl. parabot.) bilden kräftige, 3-8 μ lange und 0,5-0,8 μ breite Stäbchen mit abgerundeten Enden. Man findet sie einzeln, zweigliedrig, in kurzen Ketten und längeren Fäden. Die Sporen sind ovoid, liegen zentral oder subterminal bis terminal und treiben die Bakterienzelle mehr oder weniger auf. In flüssigen Nährmedien bewegen sich die Stäbchen lebhaft mit Hilfe langer, peritrischer Geißeln.
In jungen Kulturen färben sich die Stäbchen grampositiv. Nach mehrtägiger Bebrütung findet man zahlreiche gramlabile und gramnegative Keime. Die Sporen sind nach der Färbung von Rakette darstellbar.
Cl. bot. ist ein strikt anaerob wachsender Keim. Cl. parabot. ist auch unter weniger anaeroben Bedingungen zum Wachstum befähigt (Bergey 1957 (10)).
Beeinflußt durch die Angaben früherer Autoren (van Ermengem 1897 (43), Römer 1900 (113), Würcker 1909 (151) u.a.) wird die Bebrütungstemperatur heute noch vielfach zu niedrig angegeben. Abgesehen von Cl. bot. Typ E, der Temperaturen von 30°C bevorzugt, wachsen alle Typen sehr gut bei 35 - 37°C.
In der Leberbouillon nach Tarozzi vermehren sich die Keime üppig unter Trübung und Gasbildung. Auf Traubenzuckerblutagar nach Zeissler bildet der Keim nach 48 Std. farblose oder blaßgraue, glänzende, runde, wenig erhabene Kolonien mit schwach hämolytischem Hof (α-Hämolyse). Die Hämolyse kann aber auch, besonders bei schwachem Wachstum, ganz fehlen. Zuweilen bildet der Keim ein Geflecht lockenförmiger Schlingen mit parallel angeordneten Ausläufern, die schleifenartig zur Kolonie zurückkehren. Diese Wuchsform kann zu Verwechslungen mit den Kolonien von Cl. novyi führen.
Frische Botulinuskulturen strömen einen Geruch nach Bittermandelöl aus.

c) Sporenbildung

Die Sporenbildung ist bei verschiedenen Stämmen sehr unterschiedlich und stark vom Nährmedium abhängig. Vergärbare Kohlenhydrate hemmen infolge von Säurebildung die Versporung. Ungünstig beeinflussen die Sporulation ferner Chloride und Nitrate, während Ammoniumsalze, Sulfate, Phosphate und Kalziumionen diese stimulieren. Je geringer die 0_2-Spannung im Medium ist, um so besser sind die Versporungsergebnisse (L e i f s o n 1931 (84)). Die Aminosäuren, Glycon, Ornithin, Arginin, β -Alanin und Kreatin fördern die Sporenbildung, (W i l l i a m s und B l a i r 1950 (149)). Zu hohe Nährbodenkonzentrationen verringern die Versporungsrate. Die optimale Bebrütungstemperatur liegt zwischen 30-37°C (W y n n e 1948 (152)). T r e a d w e l l, J a n n und S a l l e 1958 (141) berichten, daß die Sporenauskeimung durch $NaHCO_3$, W y n n e , S c h m i e d i n g und D a y e 1955 (154), daß sie durch Natriumthioglykollat gefördert wird. Die verzögerte Auskeimung (Dormancy) kann durch den Zusatz von 0,1 % löslicher Stärke aufgehoben werden (W y n n e und F o s t e r 1948 (153)). Die Wirkung der Stärke beruht auf einer unspezifischen Adsorption keimungshemmender Substanzen z.B. Fettsäuren im Nährmedium (O l s e n und S c o t t 1950 (101)).
Subletale Erhitzung regt die Sporenkeimung an (E v a n s und C u r r a n 1943 (45)).
Die Hitzeresistenz der Botulinussporen ist nach Typen und Stämmen sehr unterschiedlich. Auffallend ist die geringe Resistenz von Cl. bot. Typ E. Mit zunehmender Azidität nimmt die Hitzeresistenz ab. Ascorbinsäure verlängert die Abtötungszeit (R e y n o l d s und L i c h t e n s t e i n 1950 (112)).
S u g i y a m a (1951, 132) berichtet, daß Sporen, die bei 37°C gebildet werden, am widerstandsfähigsten sind. Kohlenhydrate, Fettsäuren, Ca^{++} und Fe^{++} erhöhen die Hitzeresistenz. Im allgemeinen werden die Sporen in trockener Hitze bei 180°C in 15 Minuten abgetötet. Strömendem Wasserdampf widerstehen sie 3 1/2 - 5 Stunden lang. Vegetative Keime werden bei 80°C in 15 Minuten sicher abgetötet (T a n n e r und D a c k 1922 (133)).
Zur chemischen Abtötung bewährt sich 10 % Salzsäure (vernichtet feuchte Sporen bei 18°C in 1 Std.) und Formalin (24 Std.), (D o z i e r 1924 (38)).

d) Biochemische Eigenschaften

Sowohl Cl. bot. als auch Cl. parabot. verflüssigen Gelatine und bilden Säure und Gas aus Glukose, Fruktose und Maltose. Salicin wird nur von den Parabotulinus

stämmen fermentiert, dagegen nicht Inosit, das von den Botulinusstämmen angegriffen wird. Cl. parabot. bringt im Gegensatz zu Cl. bot. Milch langsam zur Gerinnung, verdaut und schwärzt Hirnbrei und verflüssigt hitzekoaguliertes Hühnereiweiß. Die H_2S- und NH_3-Bildung ist bei den proteolytischen Stämmen besonders ausgeprägt (B e r g e y 1957 (10)).
Arbeiten über den Bedarf an essentiellen Aminosäuren stammen von K n i g h t (1936, 77), R o e s s l e r und B r e w e r (1946, 114). Die nutritiven Ansprüche wurden von M a g e r , K i n d l e r , und G r o s s o w i c z (1954, 87) untersucht.

e) Antigene Struktur

Das Botulinustoxin besitzt starke immunisierende Eigenschaften. B o r o f f und C a b e e n (1954, 16) regten durch i.v.-Injektion eines atoxischen Typ C-Stammes bei Kaninchen die Bildung von Antikörpern an, die auch gegen toxische Typ C-Stämme wirksam waren. Neben der für die Diagnostik bedeutungsvollen Toxinspezifität treten andere antigene Eigenschaften stark zurück. Es sind agglutinierende und komplementbindende Antikörper bekannt (S t a r i n und D a c k 1923 (128), S c h o e n h o l z und M e y e r 1925 (117)), die aber praktisch bedeutungslos sind, da sie sich nicht mit den Toxintypen decken.
M a n d i a (1951, 88) unterscheidet bei Typ A vier, bei Typ B drei serologische Gruppen. Mc C l u n g (1937, 91) und B a r g (1940, 6) stellten eine Antigengemeinschaft von Cl. bot. und Cl. sporogenes fest. L a m a n n a (1948, 79) entdeckte bei Cl. parabot. Typ A ein mit dem Toxin eng verbundenes Hämagglutinin, B r y g o o (1950, 20) fand bei Cl. bot. Typ C ein hitzelabiles Hämolysin, das durch Botulinusantiseren Typ A, B und C und durch Cl. perfringens neutralisiert wird. Es handelt sich um eine Lecithinase, die mit dem Faktor α von Cl. perfringens identisch ist.

f) Vorkommen und Verbreitung des Erregers

Cl. bot. ist ein ubiquitär im Boden vorkommender Keim (M e y e r 1929/1956, (95)). M e y e r und D u b o v s k y (1922 a,b,c (96)) fanden den Typ A vorwiegend in nicht bebauten Böden, während der Typ B vorwiegend aus Kulturböden isoliert wurde, was auch sein Vorherrschen in Europa erklärt. Der Typ C wird häufig in Südafrika, Australien, Nordamerika und Frankreich gefunden.

Der Typ D ist in Australien und Südafrika verbreitet. Cl. bot. Typ E wurde bisher vor allem aus Fischen in nördlichen Breiten isoliert (ref. nach Prévot 1955 (104) und wird im Gegensatz zu den anderen Typen als Meeresorganismus betrachtet (Lamanna 1959 (79)). Daraus wird auch auf seine geringere Hitzeresistenz geschlossen. Entgegen anderen Anaerobiern ist Cl. bot. im Darm gesunder Menschen selten anzutreffen (Easton und Meyer 1924 (41), Kahn 1924 (69)). Dagegen können, wie neuere Untersuchungen ergaben, gesunde Tiere Cl. bot. im Körper beherbergen. So berichten Prévot und Huet (1951, 106) über Isolierungen aus den Eingeweiden von Fischen, Verge und Goret (1947, 144), Easton und Meyer (1924, 41) von Keimnachweisen im Darm gesunder Schweine und Meyer (1956, 95) von Funden bei Schafen. Prévot und Brygoo (1953, 105) züchteten Cl. bot. aus den Lebern gesund geschlachteter Rinder. Records und Vawter (1921,111) fanden Cl. bot. auch im Darm von Rindern.

2. Das Toxin von Clostridium botulinum

a) Toxinbildung

Die Toxinbildung findet unter anaeroben Verhältnissen in den verschiedensten Nährböden statt, die ein Wachstum erlauben. Sie wurde in Dekokten aus Mais, Erbsen, Stroh, Heu und Luzerne beobachtet (Prévot und Brygoo 1953 (105)), in Fleisch und Leberextrakten, in Caseinbrühe und in vielen synthetischen Nährmedien. In Milch ist die Toxinbildung schlecht infolge der Säurebildung (Schoop und Harms 1935 (119)).
Stevenson, Helson und Reed (1947, 131) erhielten in tryptisch verdautem Caseinnährboden, der mit Maisfiltrat, Glukose und Hefeextrakten versetzt worden war, hochwirksame Toxine.
Sterne und Wentzel (1950, 129) konnten durch Züchtung von Cl. bot. der Typen C und D in Zellophansäcken, die in das Nährmedium eingetaucht wurden, Toxine gewinnen, die im Vergleich zu den in den Nährmedien gebildeten Toxinen um das 50-100 fache stärker waren. Nach Kindler, Mager und Grossowicz (1955, 1956 (76) ist Glukose, Tryptophan, Arginin für die Toxinbildung sehr wichtig. Streptomycin, Chloramphenicol und Chlortetracyclin bewirken eine Toxinabnahme um 50 %. Verschiedene Begleitkeime beeinflussen die Toxinbildung. Francillon (1925, 47) fand eine starke Hemmung durch Pseudomonas aeruginosa. In aeroben Mischkulturen mit Mikrokokken, E. coli, Str. pyogenes und Proteus vulgaris war trotz guten Wachs-

tums die Toxinsynthese vermindert. Sherman, Stark und Stark (1927, 126) fanden außerdem eine Abschwächung durch Str. lactis und Laktobazillen. Jordan und Dack (1924, 66) beobachteten eine Zerstörung des Toxins durch Cl. sporogenes. Dagegen soll in Mischkulturen mit Bac. subtilis und Sarzinen die Toxizität gefördert werden (Grodko, ref. nach Prévot (1955, 104).

Tanner und Oglesby (1936, 134) berichteten, daß die Toxine bei Temperaturen über 15°C entstehen. Als Temperaturoptimum werden 35°C angegeben.

Entgegen der alten Auffassung, daß Cl. bot. ein Ektotoxin bilde, wird nach den Untersuchungen von Nelson (1927, 100), Boroff (1955, 15), Kindler, Mager und Grossowicz (1955, 76) und Bonventre und Kempe (1959, 14) das Toxin durch Autolyse der Keime frei. Es handelt sich also um ein Endotoxin.

Prévot und Brygoo (1950, 105) konnten aus jungen, gewaschenen Kulturen nach der Methode von Raynaud und Segond (1949, 110) Toxin extrahieren. Keppie (1951, 74) gelang es, durch die mechanische Zertrümmerung gewaschener und erhitzter Sporen Toxin freizusetzen.

b) Chemische und physikalische Eigenschaften des Botulinustoxins

Das Botulinustoxin ist ein einfaches Protein mit Globulincharakter, das beim Typ A-Toxin aus 19 Aminosäuren aufgebaut ist (Buehler, Schantz und Lamanna 1947 (21). Das Typ A-Toxin konnte von Lamanna, McElroy und Eklund (1946, 80) durch Säurefällung und Salzpräzipitation und von Abrams, Kegeles und Hottle (1946,1) durch Alkoholfällung und Salzpräzipitation in kristalliner Form dargestellt werden. Elektrophoretische Untersuchungen, Sedimentierungen mit Hilfe der Ultrazentrifuge, Molekulargewichtsbestimmungen (Putnam, Lamanna und Sharp 1946 (109)) und die Analyse der Aminosäuren ließen auf eine homogene Substanz schließen. Das von Putnam und Mitarbeitern (109) ermittelte Molekulargewicht liegt bei 900 000. Wagman (1954, 145) fand, daß das Toxin bei einem pH von 6,5 in kleinen Komponenten mit einem Molekulargewicht zwischen 40 000 und 100 000 dissoziiert. Eine dieser Komponenten war um das 2-3 fache toxischer als das Gesamtmolekül. Daraus kann geschlossen werden, daß das kristalline Toxin neben toxischen Komponenten auch atoxische Bestandteile enthält. Eine atoxische Komponente fanden Lowenthal und Lamanna (1953, 86) als Hämagglutinin, das sie durch Adsorption an Erythrozyten darstellten.

Nach Prévot und Brygoo (1953, 105) sind die Toxine der Typen A, B und E sehr thermolabil. Sie werden in 15-20 Minuten bei 80°C zerstört. Die C- und D-Toxine benötigen eine 15-20 Minuten dauernde Erhitzung auf 100°C. Nach Bronfenbrenner und Schlesinger (1924, 18), Scott und Stewart (1950, 123) ist der pH-Wert von großem Einfluß. Die größte Stabilität hat das Toxin bei pH 5.
Gegenüber oxydierenden Substanzen ist das Toxin sehr empfindlich (Jude, Girard und Carrat (1949, 67)). Bellinger, Körnlein und Lembke (1951, 7) konnten bei verschiedenen Antibioticis und Chemotherapeuticis keinen Einfluß auf das Toxin feststellen.

III. Pathogenese

Resorption und Wirkungsmechanismus des Botulinustoxins

Das Botulinustoxin ist neben dem ε und ι Toxin von Cl. perfringens das einzige peroral wirksame Anaerobengift. Nach Lamanna (1959, 79) stellt es das wirksamste, heute bekannte Toxin dar. Weniger als $0,1 \times 10^{-3}$ mg des gereinigten Typ A Toxins können eine Maus töten. Bisher ist unbekannt, welche Eigenschaften des Moleküls seine große Toxizität bedingen. Nach Schübel (1923, 120) sind neben Säugetieren und Vögeln auch Fische, Eidechsen und Frösche bei parenteraler Verabreichung für das Toxin empfänglich. Selbst bei Schnecken und Regenwürmern sind Einwirkungen auf das autonome Nervensystem festzustellen. Hinsichtlich der Resistenz gegenüber den Toxintypen bestehen große tierartliche Unterschiede (Prévot und Brygoo 1953 (105).

Viele Autoren haben den Einfluß der Verdauungsfermente auf das Toxin untersucht. Nach Bronfenbrenner und Schlesinger (1922, 18) greifen Magensäure, Trypsin und Pepsin das Toxin nicht an. Duff, Wright und Yarinsky (1956, 40) beobachteten aber einen aktivierenden Effekt von Trypsin auf das Typ-E-Toxin. Dagegen beobachteten Halliwell (1954, 59) und Coleman (1954, 30), daß das Toxin durch Trypsin und Chymotrypsin zerstört wird. Als Hauptresorptionsort gilt der Dünndarm (May und Whaler 1958 (90)). Für eine Zerstörung des Toxins im Darm spricht, daß das Toxin nach parenteraler Zufuhr etwa um das 100 000 fache wirksamer ist als bei alimentärer Aufnahme. Es ist bis heute unbekannt, wie die Toxine die Darmschleimhaut passieren. Coleman (1923, 28), Starin und Dack (1925, 128) und May und Whaler (1958, 90) stellten fest, daß

das Botulinustoxin nicht dialysiert. Da das Toxin nach Vergiftungen in nicht dialysierbarer Form aus der Lymphe und dem Blut gewonnen wurde, nimmt man an, daß es im Darm nicht in kleinere Moleküle zerlegt wird. Lodenkämper und Durchschlag (1952, 85) haben gezeigt, daß die Schleimhautschranke auch des gesunden Darmes für größere Moleküle nicht so unüberwindbar ist, wie vielfach angenommen wird (vgl. die Entstehung alimentärer Allergien). Nach Geiger (1924, 48) und Church (1923, 27) ist eine Resorption des Giftes durch Wunden möglich. Von der intakten Haut wird das Toxin nicht aufgenommen.

Seit den Arbeiten von Dickson und Shevky (1923, 36) und von Bishop und Bronfenbrenner (1936, 11) ist bekannt, daß das Botulinustoxin peripher angreift. Nach Ambache (1948, 1951, 3) kommen die Botulinustoxine an der neuromuskulären Endplatte der cholinergischen Fasern zur Wirkung. Das Zentralnervensystem bleibt unbeeinflußt (Davies, Morgan, Wright und Wright 1953 (33)).

Burgen, Dickens und Zatman (1949, 23) zeigten am Nerv-Muskelpräparat, daß eine bestimmte Inkubationszeit vergeht, bevor das Toxin zur Wirkung kommt. Die Bindung des Toxins an den unbekannten Rezeptor setzt jedoch sofort ein und ist irreversibel. Antitoxingaben sind selbst in der Latenzzeit unwirksam. Der vergiftete Muskel spricht auf direkte Reizung an (Masland und Gammon 1949 (89)). Ebenso führt Azetylcholin zur Kontraktion (Ambache 1949 (3), Thesleff 1960 (138)). Cholinesterasehemmer heben die Toxinwirkung nicht auf. Dadurch unterscheidet sich das Botulinustoxin vom Curare. Guyton und Mac Donald (1948, 56) konnten im Gegensatz zu Brooks (1953, 19) bei direkter Reizung des vergifteten Muskels eine Verringerung des freigesetzten Azetylcholins feststellen. Brooks ist der Meinung, daß das Leitvermögen der Nervenendfasern gestört wird. Stevenson (1958, 130) vertritt die Ansicht, daß die Freisetzung oder Synthese des Azetylcholins durch Botulinustoxin gehemmt wird.

Sehr viele Arbeiten der letzten Jahre befassen sich mit der Gewinnung von Toxinen und von Toxoiden (Hottle und Abrams 1947 (65), Sterne und Wentzel 1950 (129), Prévot und Brygoo 1950 (105), Katic 1957 (72), Appleton und White 1959 (4) u.a.).

Die Toxoide werden heute hauptsächlich durch Formalininaktivierung des gereinigten Toxins und Fällung mit Kaliumaluminiumsulfat (Cardella, Fiock und Wright 1958 (26)) oder durch Adsorption an Aluminiumphosphat (Wright, Duff, Fiock, Devlin, Soderstrom 1960 (150) hergestellt. Sie dienen zur aktiven Immunisierung besonders von Tieren und zur Herstellung spezifischer mono- und polyvalenter Antiseren.

IV. Symptomatologie des Botulismus

Der Botulismus als alimentär bedingte Intoxikation kommt sowohl beim Menschen als auch bei Tieren vor.

1. Der Botulismus des Menschen

a) Epidemiologie

Der Botulismus ist eine heute relativ seltene Krankheit des Menschen, die ihre Bedeutung aber durch ihre hohe Letalität behält. K.F. Meyer (1956, 95) konnte für die Zeit von 1875 - 1954 auf der Welt 5635 Krankheitsfälle nachweisen. Davon entfielen auf Deutschland, Frankreich, Rußland und Amerika jeweils über 1000 Erkrankungen. Die Letalität, durchschnittlich mit 30 % angegeben, ist in den U.S.A. mit 63 % am höchsten, in Deutschland mit 10-19 % und in Frankreich mit 1-8 % bedeutend geringer. In Asien und Afrika wurde der Botulismus trotz der ubiquitären Verbreitung der Keime sehr selten beobachtet. In den Vereinigten Staaten stehen Vergiftungen mit dem Typ A im Vordergrund. Dort sind verdorbene Vegetabilien die Hauptursache der Vergiftungen (98 %) (Meyer und Eddie 1951 (97), Meyer 1956 (95)).

In Europa stehen bei hauptsächlicher Beteiligung des Toxintyp B, Wurst- und Fleischwaren als Ursache an erster Stelle (Legroux, Levaditi und Jéramec 1947 (83)).

b) Symptomatik und Krankheitsverlauf

Die Inkubationszeit und der Krankheitsverlauf sind ganz von der Menge des aufgenommenen Toxins abhängig. Die ersten Symptome treten im allgemeinen nach 18-36 Std. auf. Im Gegensatz zu anderen Lebensmittelvergiftungen werden nur selten gastroenterale Störungen wie Durchfall, Leibschmerzen und Erbrechen beobachtet. Die Symptomatik ist die einer Bulbärparalyse. Pathognomonisch sind okuläre Störungen (Augenflimmern, Diplopie, Mydriasis, Strabismus, Blepharoptosis und Nystagmus). Damit verbunden sind Schluck- und Sprechbeschwerden, Salivation oder völliges Versiegen der Speichelsekretion. Die allgemeine Muskelschwäche führt in schwereren Fällen zu Paresen und Paralysen. Die Reflexe bleiben erhalten. Bei ungestörtem Sensorium tritt der Tod durch Lähmung der Atmungsmuskulatur ein.

Die Temperatur der Kranken ist normal oder subnormal. Atmung und Puls sind stark beschleunigt. Häufig führt eine Atonie des Darmes und der Blase zu Obstipationen und Anurie. Als Komplikation tritt häufig eine Aspirationspneumonie ein. Wenn die Krankheit nicht zum Tode führt, können Paralysen und Paresen über Monate fortdauern.

c) Diagnose, Differentialdiagnose und patholog. Anatomie

Die Diagnose gründet sich auf kulturelle Methoden und den Toxinnachweis aus Speiseresten und aus dem Magen-Darm-Inhalt mit Hilfe des Serumschutzversuches bei Mäusen. Dubovsky und Meyer (1922, 39) und Wheeler und Humphreys (1924, 147) gelang der Toxinnachweis auch aus den Faeces. Die Möglichkeit eines Toxinnachweises im Blut (Blumberger und Gross 1936 (13), Grilichess 1943 (53)) wird von Prévot und Brygoo (1953, 105) angezweifelt.
Differentialdiagnostisch kommen mehrere in Form einer Bulbärparalyse verlaufende Krankheiten in Frage, so die Encephalitis epidemica, Poliomyelitis, progressive Bulbärparalyse, Lues cerebrospinalis und Vergiftungen durch Methylalkohol und Atropin.
Pathologisch-anatomisch sind keine sicheren spezifischen Veränderungen bekannt. Sie beschränken sich auf sekundäre, durch die Lähmung der Atemmuskulatur bedingte Erscheinungen (Cowdry und Nicholson 1924 (32), Davies, Morgan, Wright und Wright 1953 (33)).

d) Prophylaxe

Die Prophylaxe kann sich schwierig gestalten, da die vergifteten Nahrungsmittel nicht in jedem Fall als verdorben erkannt werden. Im Fleisch können sich die Veränderungen auf sehr begrenzte Partien beschränken, was den Nachweis erschwert. In Gemüsekonserven sind die Veränderungen meist sinnfälliger. Es treten Bombagen, ranziger Geruch, Farbveränderungen und Schäumen auf. Wenn solche Nahrungsmittel überhaupt genossen werden, muß eine Hitzedurchdringung 30 Minuten bei 80°C gewährleistet sein. Eine aktive Immunisierung mit Toxoiden ist grundsätzlich möglich (Legroux, Levaditi und Jéramec 1947 (83)) wird aber in Anbetracht des seltenen Auftretens des Botulismus nicht praktiziert.

e) Therapie

Neben der symptomatischen Behandlung wie Magen-Darm-Spülungen, Ruhigstellung, Blutentzug und Blutersatz, Kollidoninfusionen und Azetylcholingaben, sowie der künstlichen Beatmung steht die Antitoxinbehandlung mit spezifischem Serum im Vordergrund (P r é v o t 1955 (104)). Je früher und massiver sie einsetzt, um so eher besteht Aussicht auf Erfolg. Manifeste Symptome lassen sich aber nicht mehr beheben. Leichte Vergiftungsfälle heilen unbehandelt aus. Bei protrahiertem Verlauf kann eine aktive Immunisierung mit spezifischem Antitoxin erfolgen (L e g r o u x , L e v a d i t i und J e r a m e c 1947 (83)), am besten in Kombination mit Antiserum als passiv-aktive Immunisierung.

2. Der Botulismus der Tiere

a) Epidemiologie

Im Gegensatz zum Botulismus des Menschen, der als seltene Krankheit bezeichnet werden kann, ist der Botulismus der Tiere in einigen Ländern von großer Bedeutung (M e y e r 1956 (95)). In Südafrika z.B. verlor die Landwirtschaft vor der Einführung der aktiven Immunisierung jährlich gegen 100 000 Tiere, hauptsächlich Rinder. Ebenso verlustreich ist der Botulismus der Schafe und Rinder in Australien. In Spanien, Frankreich und Belgien ist der Botulismus bei Pferden nicht selten. W i l l e m s (1941, 148) konnte zeigen, daß der Mal d'Aiseau, der als eine Form der Borna'schen Krankheit angesehen wurde, durch Cl. bot. verursacht wird. In Nordamerika tritt die Vergiftung bei Pferden (Forage poisoning), bei Rindern (Loin discase), bei Wildgeflügel (Western Duck Sickness), bei Hühnern, sowie in Pelztierzuchten auf.

b) Vorkommen der einzelnen Toxintypen bei verschiedenen Tierarten

Der Botulismus der Tiere wird vorwiegend durch die Toxintypen A, B, C und D erzeugt. Am häufigsten sind die durch den Typ C verursachten Vergiftungen. Im einzelnen können folgende Toxintypen bei den verschiedenen Tierarten vorkommen:

Typ A	bei Geflügel, selten bei Pelztieren
Typ B	selten bei Rindern und Pferden
Typ C α	bei Hausgeflügel, wildem Wassergeflügel
Typ C β	bei Pferden, Rindern, Schafen, Pelztieren, Geflügel
Typ D	bei Rindern.

c) Intoxikationsquellen für das Tier

Méry (1947, 94) beobachtete mehrere Botulismusfälle beim Hund, Petersen (1957, 103) bei Schweinen. Die Katze ist sehr resistent (Prévot und Brygoo 1953 (105)). Hunde, Schakale und Hyänen erlangen eine aktive Immunität durch die Nahrung. Haben sie keine Gelegenheit zur Aufnahme botulinusverseuchter Abfälle, bleiben sie für das Botulinustoxin empfänglich (Geurden (1950, 50). Die Vergiftungen beim Geflügel werden häufig durch Küchenabfälle hervorgerufen und als Limberneck bezeichnet. In Südafrika wird der Botulismus der Rinder, bekannt unter dem Namen Lamziekte, durch einen Phosphormangel im Futter begünstigt (Theiler und Mitarbeiter (1927, 137), Sterne und Wentzel (1949, 129)). Pferde, Rinder und Schafe vergiften sich durch feuchtes, schlecht gelagertes Heu, Silofutter und Getreide. Auch spielen Verunreinigungen dieser Futtermittel durch Tierkadaver, die mit Botulinuskeimen infiziert sind, eine große Rolle. Rinder vergiften sich in Massen durch das Belecken von Skeletten gefallener Tiere. Die in Tasmanien bei Rindern auftretende Midland Cattle Disease und die sog. Pica, der Botulismus der Schafe in Westaustralien, sind auf ein zu geringes Stickstoffangebot zurückzuführen, das die Tiere veranlaßt, die Kadaver von Kaninchen und anderen Tieren aufzufressen, (Seddon 1926 (124), Bennetts und Hall 1938 (9)). Nerze vergiften sich ebenfalls durch verdorbenes Fleisch (Schoop 1937 (118), Moberg 1951 (99), Vögel durch Fliegenmaden (Bengtson 1922 (8), Dinter und Kull 1954 (37)) oder faulende Pflanzenteile (Western Duck Disease), Kalmbach und Gunderson 1934 (71).
Von den Versuchstieren sind Meerschweinchen, Kaninchen, Mäuse, Hühner und Tauben sehr empfänglich, Ratten dagegen sehr resistent (Meyer 1929 (95)).

d) Symptomatik, Diagnose und Differentialdiagnose

Die Krankheitserscheinungen sind im wesentlichen dieselben wie beim Menschen: Allgemeine Muskelschwäche, Aphagie und Aphonie, sowie okuläre Störungen stehen im Vordergrund. Der pathologisch-anatomische Befund ist wie beim Botulismus des Menschen unspezifisch. Die Diagnose richtet sich nach denselben Gesichtspunkten wie beim Menschen, bereitet aber in der Praxis viel mehr Schwierigkeiten (P r é v o t und B r y g o o 1953 (105)). Bei gehäuftem Auftreten empfiehlt sich der Toxinnachweis aus der Leber gefallener Tiere (P r é v o t 1955 (104)). Differentialdiagnostisch kommen Virusencephalitiden, durch Leberdystrophie bedingte Gehirnstörungen, die toxische Bulbärparalyse der Pferde und Nervenlähmungen anderer Genese in Frage. Bei Vögeln ist außerdem an einen Vitamin B_1-Mangel zu denken.

e) Therapie und Prophylaxe

Im Anfangsstadium ist die Antiserumbehandlung erfolgreich, jedoch sehr aufwendig. Wichtig ist die Erkennung des Toxintyp. Alle nicht erkrankten Tiere sollten aktiv immunisiert werden.
In Südafrika, Australien und Spanien spielt die aktive Immunisierung von Rindern, Schafen und Einhufern mit Toxoid-Impfstoffen eine große Rolle. Daneben kann die Zahl der Vergiftungsfälle durch eine Beseitigung des Phosphor- und Stickstoffmangels mittels Mineralsalzgaben vermindert werden. Außerdem ist sorgfältig darauf zu achten, daß Futtermittel und Tränken nicht mit Kadavern verunreinigt sind.

B. DER BOTULISMUS ALS INFEKTIONSKRANKHEIT

I. Infektionsversuche

1. Verfütterung und Injektion großer Sporenmengen

a) ohne Adjuvans

V a n E r m e n g e m (1897, 43) machte die Beobachtung, daß das Filtrat der Botulinus-Kulturen in gleichem Maße pathogen wirkte wie die Vollkultur. Dies veranlaßte ihn, sich mit der Frage der Infektiosität des Botulinusbazillus näher

zu befassen. Seine Versuche, mit entgifteten Sporen bei Tieren Botulismus zu erzeugen, verliefen negativ. Er fand, daß die Sporen, die er durch längeres Erhitzen bei 70°C, durch mehrmaliges Waschen oder durch Alkalizusatz entgiftet hatte, nach s.c., i.p. oder i.v. Injektion sehr rasch phagozytiert wurden. Da sich bei keinem der Versuchstiere Botulismussymptome zeigten, gelangte van Ermengem zu der Ansicht, daß Cl. bot. nicht pathogen sei, sondern nur durch sein außerhalb des Körpers gebildetes Gift wirke. Er bezeichnete den Mikroorganismus als einen toxicogenen, nicht pathogenen Saprophyten. Die gelegentlichen positiven Organbefunde bei an Botulismus gestorbenen Menschen, führte er auf postmortale Einwanderung zurück.
Die Auffassung van Ermengems fand Unterstützung durch die Arbeiten von Römer (1900, 113), Forssmann (1901, 46), Landmann (1904, 81) und Dickson (1918, 35). Ein Hauptargument gegen die Infektiosität fanden viele Autoren in dem mangelhaften Wachstum der isolierten Botulinusstämme bei Körpertemperatur.
Die von Burke (1919, 24), Orr (1919, 102) und anderen gemachten Beobachtungen, daß die amerikanischen Botulinus-Stämme auch bei 37°C in geeigneten Medien sehr gut wachsen und Toxin bilden, sowie die Bestätigung dieser Befunde für die europäischen Stämme durch Bitter (1921, 12) lenkte aber erneut die Aufmerksamkeit auf die Frage der Infektiosität des Botulinusbazillus.
Graham und Brückner (1919, 51) untersuchten bei mehreren spontanen Fällen von Forage-poisoning das Blut und die Organe der gefallenen Pferde, ohne Cl. bot. nachweisen zu können. Auch Infektionsversuche an 26 Tieren, denen entgiftete Sporensuspensionen verfüttert oder s.c. injiziert worden waren, blieben ohne Erfolg. Armstrong, Story und Scott (1919, 5) injizierten einem Meerschweinchen 300 Millionen Sporen s.c., ohne ihm zu schaden. Nur bei zwangsweiser Verfütterung sehr großen Mengen gewaschener Sporen erkrankten einige Meerschweinchen an Botulismus, während die freiwillige Aufnahme der Sporen mit dem Futter ohne Folgen blieb.
Thom, Edmondson und Giltner (1919, 139) konnten nach anfangs fehlgeschlagenen Infektionsversuchen ein Jahr später (Edmondson, Giltner, Thom 1920 (42)) durch s.c. Injektion von 30 Millionen entgifteten Sporen des Boise-Stammes bei einem Meerschweinchen tödlichen Botulismus hervorrufen. Oral verabreicht führten 180-192 Millionen Sporen innerhalb von 5-7 Tagen zum Tode. Die Sporensuspensionen des Nevin-Stammes dagegen waren bei s.c. Verabreichung apathogen. Nur in einem Fall verursachte die Verfütterung von 78 Millionen Sporen dieses Stammes nach 7 Tagen auch den Tod eines Meerschweinchens. Weitere Fütterungsversuche mit noch massiveren

Dosierungen blieben jedoch erfolglos. Trotz der unregelmäßigen Resultate waren E d m o n d s o n und seine Mitarbeiter von der Pathogenität entgifteter Botulinussporen überzeugt. Als Ursache der Intoxikation erwogen sie sowohl das Freiwerden von intrazellulärem Toxin, als auch die Auskeimung der Sporen und aktives Wachstum.

O r r (1922, 102) verwendete zwei Typ A-Stämme und einen Typ B-Stamm. Nach der Verfütterung von 90-200 Millionen Sporen beobachtete er unregelmäßige Erfolge. Die Injektionen von 45-50 Millionen Sporen bei Mäusen und Meerschweinchen führten bei letzteren meistens am 3. - 4. Tag zum Tode, während nur wenige Mäuse der Infektion erlagen. Bei s.c. Injektion der Sporensuspensionen trat der Botulismus häufiger auf als nach i.p. Verabreichung. O r r glaubt, daß die Sporen bei i.p. Injektion mehr der Phagozytose ausgesetzt sind. Durch Präzipitation nach der Methode von B r o n f e n b r e n n e r und S c h l e s i n g e r (1919, 18) und durch Verfütterung von Organemulsionen der gestorbenen Tiere konnte O r r das Botulinustoxin nachweisen. Die Entstehung des Giftes führt er auf ausgekeimte Sporen zurück.

G e i g e r , D i c k s o n und M e y e r (1922, 49) diskutieren in einer Abhandlung über den Botulismus die Pathogenität entgifteter Sporen. Auf Grund eigener, negativ verlaufener Infektionsversuche mit Sporensuspensionen, die mit spezifischem Antitoxin vorbehandelt, gewaschen und auf 80°C erhitzt worden waren, äußern die Verfasser Zweifel an der völligen Entgiftung der Sporensuspensionen anderer Autoren. Hinsichtlich der positiven oralen Infektionsversuche weisen sie darauf hin, daß in manchen Fällen vergiftete Speisen, ungekocht genossen, zu Botulismus führten, während sie nach Erhitzung von anderen ohne Schaden gegessen wurden, obwohl sie zweifellos zahlreiche Sporen enthielten.

Auch B u r k e , E l d e r und P i s c h e l (1921, 25) halten nach der Untersuchung zahlreicher Vergiftungsfälle beim Menschen die Aufnahme entgifteter Botulinussporen für unschädlich.

G r a h a m und E r i k s e n (1922, 52) konnten bei Hunden durch parenterale Toxingaben Botulismus erzeugen. Die Verfütterung keimhaltigen Fleisches und s.c. Injektionen von 19-95 Millionen entgifteter Sporen blieben jedoch erfolglos.

Dagegen gelang es C o l e m a n und M e y e r (1922, 29) durch Verfütterung und Injektion sehr großer Sporenmengen (bis zu 11 Milliarden) bei Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen Botulismus zu erzeugen. In Übereinstimmung mit den Arbeiten anderer Autoren konnten C o l e m a n und M e y e r keine Korrelation der verwendeten Sporenzahl zur Inkubationszeit erkennen. Sie fanden, daß die injizierten Sporen sehr rasch im ganzen Körper verbreitet werden. Den Beweis

für die Auskeimung der Sporen sahen sie neben vereinzelten positiven mikroskopischen Befunden darin, daß Nährmedien, die mit erhitzten Organemulsionen beimpft worden waren, steril blieben, während dieselben Organproben, ohne Erhitzung verimpft, Wachstum zeitigten. In einem weiteren Versuch konnten die Autoren an 3 Kaninchen nachweisen, daß Botulinussporen nach Injektion in die doppelt abgebundene Vena jugularis oder in die vordere Augenkammer auskeimen und Toxin bilden. Das Kammerwasser und das zentrifugierte Blutserum der nach 3-6 Tagen gestorbenen Kaninchen war für Mäuse toxisch.

Coleman (1923, 28) zeigte in Fortsetzung der oben beschriebenen Versuche, daß erhitzte Sporen, die in dichten Kollodiumsäckchen in die Bauchhöhle von Meerschweinchen und Kaninchen eingenäht worden waren, auskeimten und üppig wuchsen. Da das in reichlicher Menge gebildete Toxin durch die Kollodiummembran nicht dialysieren konnte, blieben die Tiere aber am Leben.
Starin und Dack (1925, 128) wiesen nach, daß Botulinuskeime, die in Kollodiumsäckchen im Tierkörper gezüchtet wurden, noch nach 4 Monaten lebensfähig waren. Mit dichten Sporensuspensionen von Cl. bot. Typ A und B, die 20 Minuten lang auf 70 - 80°C erhitzt worden waren, gelang es den Autoren, bei Versuchstieren Botulismus zu erzeugen. Sie fanden, daß Botulinussporen sehr lange im Tierkörper latent überdauern können.

b) Infektionsversuche mit großen Sporenmengen unter Verwendung gewebeschädigender Substanzen

In den bisher geschilderten, in ihrem Erfolg uneinheitlichen Versuchen, wurden die entgifteten Sporensuspensionen ohne weitere Zusätze verfüttert oder injiziert. Daneben haben einzelne Autoren nach Mitteln gesucht, die eine Infektion mit Cl. bot. begünstigen. Diese Versuche sollen im folgenden gesondert besprochen werden.
Vaillard und Vincent (1891, 143), die toxinfreie Tetanussporen im Tierkörper durch mechanische Reizung (Sand, Holz, Gewebezertrümmerung), durch chemische Schädigung (Milchsäure, Trimethylamin) oder durch Mischinfektion zur Auskeimung brachten, regten van Ermengem (1897, 43) zu ähnlichen Versuchen mit Cl. bot. an. Er injizierte entgiftete Botulinussporen zusammen mit Pseudomonas aeruginosa, mit Agar oder mit gewebeschädigenden Substanzen wie Na_2CO_3 und Milchsäure, ohne Botulismus zu beobachten.
Bullock und Cramer (1917-1919, 22) stellten fest, daß entgiftete

Sporen von Cl. tetani, Cl. perfringens, Cl. septicum und Cl. novyi nach der Injektion phagozytiert worden waren, ohne auszukeimen. Ein gewebeschädigender Zusatz von $CaCl_2$ gab den Sporen jedoch Gelegenheit auszukeimen und sich zu vermehren. Die Autoren bezeichneten dieses, schon früheren Autoren bekannte Phänomen, Kataphylaxis oder Defense rupture.
Teale und Bach (1919-1920, 136) bestätigten bei Untersuchungen mit Cl. tetani die Beobachtungen von Bullock und Cramer. Sie entdeckten weitere Stoffe mit kataphylaktischer Wirkung, so $FeCl_3$, Na_2CO_3, Gelatine, Pepton und Tierkohle.
Edmondson, Giltner und Thom (1920, 42) berichten, daß die Injektion von Botulinussporen zusammen mit $CaCl_2$ die Infektion erleichtert. Bei örtlich getrennter Injektion fanden sie, daß die Inkubationszeit um so kürzer war, je dichter die Depots gesetzt wurden. Wenn das $CaCl_2$ 48 Stunden nach der Sporeninjektion verabreicht wurde, blieb es wirkungslos.
Coleman und Meyer (1922, 29) riefen bei Meerschweinchen durch gleichzeitige Injektion von Botulinussporen und $CaCl_2$ Botulismus hervor. Dagegen blieben Tiere am Leben, die 8-14 Tage nach der Sporeninjektion Na_2CO_3, Chininsulfat oder Milchsäure erhalten hatten. Untersuchungen ergaben, daß die Sporen schon nach 6 Stunden nicht mehr an der Injektionsstelle nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz zu Edmondson, Giltner und Thom (1920, 42) sahen sie keine Hemmung der Phagozytose durch $CaCl_2$.
Hall und Davis (1923, 58) und Starin und Dack (1925, 128) konnten entgegen Edmondson, Giltner und Thom, Coleman und Meyer keinen fördernden Einfluß von $CaCl_2$ auf die künstliche Infektion von Meerschweinchen mit Botulinussporen feststellen. Allgemein fanden sie jedoch, daß die parenterale Verabreichung großer Sporenmengen bei Meerschweinchen zu tödlichem Botulismus führte, während die Verfütterung ohne schädliche Wirkung blieb.

2. Infektionsversuche mit kleinen Sporenmengen unter Verwendung gewebeschädigender Substanzen

Sämtlichen bisher beschriebenen Infektionsversuchen war die Verwendung sehr großer Sporenmengen gemeinsam.
Um die Möglichkeit einer Intoxikation durch bei der Phagozytose freiwerdendes Gift auszuschließen, infizierte Coleman (1929, 28) Meerschweinchen,

nach Schädigung der Muskulatur mit 0,6 - 0,8 ml 10%igem Formalin, durch sehr geringe Sporenmengen von zwei Typ A-Stämmen. Es gelang ihm mit minimalen Sporenmengen (25 Sporen) Botulismus hervorzurufen. In Ausstrichen des infizierten Gewebes konnte er in großer Zahl Sporen und vegetative Keime feststellen.
Im Jahre 1951 untersuchte K e p p i e (74) an Mäusen die infektiösen Eigenschaften zweier Stämme von Cl. parabot Typ A. Er fand, daß 20 Millionen gewaschener und erhitzter Sporen, die i.m. injiziert wurden, Botulismus erzeugen können ohne auszukeimen. Histologische Schnitte zeigten sehr viele phagozytierte Sporen. Durch mechanische Zertrümmerung gewaschener und erhitzter Sporen konnte K e p p i e Toxin freisetzen. 50 Millionen Sporen reichten aus zur Gewinnung einer Mäuse-LD_{50}. Bei Schädigung der Muskulatur der Mäuse mit 2,5 % $CaCl_2$ waren bedeutend weniger Sporen notwendig, um Botulismus zu erzeugen. Die Sporenzahl einer Mäuse-LD_{50} betrug dann nur etwa 50 000.

3. Die Infektion auf alimentärem Wege

W i l l e m s (1951, 148), der als Ursache des sog. Mal d'Aiseau Cl. bot. Typ C nachweisen konnte, gelang es mit fünfmal gewaschenen Sporen bei Pferden Botulismus hervorzurufen. Er räumt allerdings ein, daß doch möglicherweise geringe Toxinreste für die Erkrankung verantwortlich waren.
Immer wieder haben Autoren die Meinung geäußert, daß das Botulinustoxin in der Lage sei, den Weg für das Eindringen der Keime in den Körper freizumachen. So beschreibt H i n k l e m a n (1927, 62), drei Botulismusfälle beim Menschen, bei denen er angeblich aus dem Blut und Liquor cerebrospinalis Cl. bot. isolieren konnte. K u d o (1931, 78) und D i n t e r und K u l l (1954, 37) berichten über die Nachbildung von Toxin im Darm bei Versuchstieren und Küken. S c h w e d o w (1960, 122) beobachtete, daß bei Meerschweinchen die Verabreichung eines Gemisches von Toxin und Erreger wirksamer war als die alleinige Toxinverabreichung.
Der Ansicht, daß Cl. bot. kein harmloser Saprophyt sei, haben auch mehrere französische Autoren zugestimmt. L e g r o u x und J é r a m e c (1944, 82) konnten bei Schweinen, die bis zur Schlachtung gefüttert wurden, eine digestiv verursachte Bakteriämie durch verschiedene Clostridien nachweisen und erklären damit auch die Infektion von Schweinefleisch. V e r g e und G o r e t (1947, 144) glauben, daß der Botulismus der Tiere ebenso häufig durch die Auskeimung aufgenommener Sporen entstehe, wie durch reine Intoxikation. Rinder,

Schweine und Gänse, die gegenüber Cl. bot. widerstandsfähiger sind, sollen häufig latent infiziert sein. Prévot und Rossi (1948, 108) stellten in Meerschweinchenversuchen fest, daß fünfmal gewaschene Kulturen von Cl. bot. genauso tödlich wirkten wie filtriertes Toxin. Prévot (1955, 104) geht sogar so weit, den Botulismus mit den Gasödemen und dem Tetanus unter den allgemeinen Begriff "Toxi-infections" zu verweisen: "Le botulisme était considéré jusqu'à ce jour comme une intoxination et elle prouve qu'il peut se présenter aussi comme une toxi-infection analogue au tétanos ou à la gangrène gazeuse".

II. Die Isolierung von Clostridium botulinum aus Wunden

Zu der ubiquitären Verbreitung von Cl. bot. im Boden stehen die seltenen Isolierungen dieses Keimes aus verschmutzten Wunden in einem schwer erklärbaren Gegensatz.
Nach einer Zusammenstellung von Zeissler u. Mitarbeitern (1958, 156) haben im Ersten Weltkrieg Weinberg und Séguin (1918, 146) in 126 Fällen, Sacquépée (1918, 116) in einer unbekannten Zahl von Fällen, McIntosh (1918, 92) in 93 Fällen und Henry D. (1917, 61) in 150 Fällen die Anaerobenflora von Kriegswunden untersucht. Keiner der Autoren erwähnt Clostridium botulinum. Im Zweiten Weltkrieg untersuchten Zeissler und Rassfeld 180 gasödemverdächtige Wunden, Schulz und Utermöhl (121) 45 Fälle, berichten aber in keinem Fall von Cl. bot. (Ref. nach Zeissler und Mitarb. 1958, 156). Dagegen sollen Altemeier, Rustigian und Cipriani bei 36, Smith und George bei 110 und McLennan bei 259 bakteriologischen Wunduntersuchungen vereinzelt Botulinuskeime festgestellt haben. (Ref. nach Zeissler, Krauspe und Rassfeld-Sternberg (156, Bd. 1, S. 36). Pulaski, Meleney und Spaeth (1941, 108) isolierten aus 200 Wunden 46 mal Clostridien, darunter einmal Cl. bot. In keinem der untersuchten Fälle kam es zu einer Gasödemerkrankung. Hall (1945, 57) berichtet über drei erfolgreiche Isolierungen von Cl. bot. aus Wunden. Zweimal fand er den Typ A, einmal den Typ B. In keinem Fall kam es zu Botulismus. Aus weiteren 2493 Wunden konnte Cl. bot. nicht isoliert werden.

III. Manifeste Wundinfektionen beim Menschen

Da in der umfangreichen, kaum überschaubaren bakteriologischen Kasuistik der Wundinfektion Cl. bot. nur in den wenigen zitierten Fällen festgestellt wurde,

ist es auffallend, daß in einem Jahr gleich drei tödlich verlaufene Wundinfektionen beim Menschen mit Cl. bot. veröffentlicht wurden.

1. D a v i s , M a t t m a n und W i l e y (1951, 34) beobachteten bei einem 15-jährigen Mädchen nach einem Fenstersturz, der eine Fraktur des linken Unterschenkels und eine Eröffnung des rechten Tarsalgelenkes zur Folge hatte, eine tödliche Infektion. Nach sorgfältiger Wundexzision, örtlicher und allgemeiner Sulfonamidbehandlung und einer prophylaktischen Tetanusantitoxingabe bildete sich am dritten Tag in dem rechten Unterschenkel Gas. Trotz tiefer Inzisionen und der Verabreichung von polyvalentem Gasbrandserum mußte der Unterschenkel am fünften Tag amputiert werden. Am 10. Tag wurde auch Gas im frakturierten linken Unterschenkel festgestellt. Am 14. Tag stellten sich okuläre Störungen (Diplopie, Nystagmus), Schluckbeschwerden, Aphonie und eine allgemeine Muskelschwäche ein, die am 16. Tag durch Lähmung der Atmungsmuskulatur zum Tode führte.
Aus dem anfänglich entnommenen Wundgewebe wurde neben hämolytischen Streptokokken Cl. tetani und ein weiterer grampositiver Anaerobier isoliert. In einem Serumschutzversuch erhielten mehrere Gruppen mit je 2 Mäusen Tetanus-, Novyi-, Sporogenes (Sordelli)-, Cl. bot. Typ A- und Cl. bot. Typ B-Antiseren. Zwei weitere Mäuse erhielten kein Serum. Bis auf die mit dem Cl. bot. Typ A Antiserum immunisierten Mäuse starben alle an "großer Muskelschwäche". Pathologisch-anatomisch wurden nur Stauungserscheinungen festgestellt.

2. Der zweite Fall wurde von H a m p s o n (1951, 60) beschrieben. Ein Mann, der sich mit einer Säge am Oberschenkel verletzt hatte und in ambulanter Behandlung stand, zeigte am sechsten Tag Ptosis, Nystagmus, Aphonie, starke Schluck- und Atembeschwerden. Nach Einlieferung in die Klinik wurde nach bereits vorangegangener Verabfolgung ein zweites Mal Tetanusantitoxin verabreicht und die Wunde behandelt. Außerdem erhielt der Patient 500 000 E Penicillin. Die Ärzte vermuteten eine bulbäre Poliomyelitis und eine Encephalitis. Am 9. Tag starb der Patient. Die histopathologische Untersuchung des Gehirns und Halsmarkes erbrachte keinen Beweis für die gestellte Diagnose.
Der einzige Keim, der aus der Wunde isoliert werden konnte, war ein grampositiver Anaerobier, der ein hitzelabiles Toxin bildete und für Meerschweinchen toxisch war. Polyvalentes Cl. bot. - Antitoxin schützte die Meerschweinchen gegen die künstliche Infektion. Wie Neutralisationsteste zeigten, handelte es sich um Cl. bot. Typ A.
Infektionsversuche mit entgifteten Sporen des isolierten Anaerobiers bei Meerschweinchen verliefen erfolglos. Wenn die Sporen jedoch mit steriler Erde oder

mit mazeriertem Hirngewebe in die Muskulatur injiziert wurden, starben die Tiere innerhalb von 72 Stunden.

3. Der dritte im Jahre 1951 veröffentlichte Fall wurde von T h o m a s , K e l e h e r und M c K e e (140) beschrieben.

Ein 13 - jähriger Junge, der durch einen Schrotschuß am linken Oberschenkel verletzt worden war, hatte am 5. Tag Schwierigkeiten beim Sprechen und konnte nicht husten. An den folgenden zwei Tagen war er nicht imstande Speisen abzuschlucken. Er litt an Halsschmerzen und konnte den Kopf nur mit Mühe heben. Die 7., 9. und 12. Gehirnnerven (N. facialis, N. glossopharyngeus und N. hypoglossus) waren bilateral gelähmt. Die Reflexe waren erhalten. Am Oberschenkel befand sich eine 2 cm große, übelriechende, bis auf den Femur reichende Wunde mit geringer Gasbildung. Der Leistenlymphknoten war geschwollen. Nach Entfernung der Schrotkugeln und Wundexzision erhielt der Patient alle drei Stunden 200 000 E Penicillin i.m., 20 000 E Tetanusantitoxin und 20 000 E Diphtherieantitoxin. Dennoch verschlechterte sich sein Zustand. Der Speichel mußte abgesaugt und Sauerstoff zugeführt werden. Bluttransfusionen, Dextrose und Kochsalzlösung i.v. blieben erfolglos. Die Temperatur wurde subnormal, der Puls war klein und frequent, die Haut kühl, feucht und zyanotisch. Neun Tage nach der Verletzung und vier Tage nach dem Auftreten der Symptome trat der Tod infolge Lähmung der Atemmuskulatur ein. Die Wunde klaffte auseinander und hatte nekrotische Ränder, der Femur war schräg frakturiert. In der Tiefe fanden sich keine Zellnekrosen. Die Entzündung war geringer als bei Gasbrand. Die übrigen pathologisch-anatomischen Veränderungen waren sekundär durch die Atemlähmung bedingt.

Die bakteriologische Untersuchung der Wunde zeigte neben Staph. aureus, α-hämolytische und anhämolytische Streptokokken, Pseudomonas aeruginosa und außerdem zwei anaerobe Sporenbildner, die kulturell und im Tierversuch als Cl. perfringens und als Cl. bot. Typ A identifiziert werden konnten.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methodik

I. Züchtung des Erregers

Die Infektionsversuche wurden mit einem Stamm von Cl. bot. Typ B (Cl. parabot. Typ B Bengtson 1924) durchgeführt, der freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Janet B. G u n n i s o n , University of California, San Francisco, dem Institut zur Verfügung gestellt wurde. Für die Züchtung und die fortlaufende Überprüfung

der Kulturen auf Reinheit wurde die von Z e i s s l e r (1930, 155) angegebene Technik übernommen.
Die Züchtung der Kulturen erfolgte in Leberbouillon nach T a r o z z i und auf Traubenzuckerblutagarplatten. Die Leberbouillonröhrchen wurden vor der Beimpfung stets 15 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt, um den Sauerstoff auszutreiben. Die beimpften Nährmedien wurden in Anaerobenkulturtöpfen nach Z e i s s l e r nach Absaugen der Luft mit der Pfeiffer'schen Vakuumpumpe bei 35°C bebrütet. Nach spätestens 18 Stunden zeigte sich das Wachstum durch Gasbildung und Trübung der Leberbouillon an. Am dritten Tag waren die Keime mit dem verdauten Material sedimentiert. Die bewachsenen Nährmedien strömten beim Öffnen der Glastöpfe einen intensiven, putriden Geruch aus.
Unter sorgfältigem Verschluß konnten die Leberbouillonkulturen wochenlang im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.
Die mikroskopische Betrachtung der Kulturen erfolgte im Nativpräparat im Phasenkontrastverfahren und in gramgefärbten Präparaten. Die Reinheit der Leberbouillonkulturen wurde durch laufende Überimpfung auf vorgetrocknete Traubenzuckerblutagarplatten im Kolonienvereinzelungsverfahren geprüft. Die beimpften Blutplatten wurden in evakuierten Mikroanaerostaten nach K n o r r bebrütet. Daneben wurden stets mehrere Blutplatten massiv beimpft und aerob bebrütet, um Verunreinigungen mit fakultativ anaeroben und aeroben Keimen überprüfen zu können.
Nach dreitägiger Bebrütung wurden von den bewachsenen Blutplatten mit Hilfe des Plattenmikroskopes typische Einzelkolonien oder deren Ausläufer isoliert und auf Leberbouillon verimpft. Häufige Passagen von Blutplatten auf Leberbouillon ließen keine Verunreinigung des Botulinusstammes durch andere Keimarten erkennen.
Die i.p. Injektion von 0,5 ml Kulturfiltrat führte bei Mäusen nach 18 Stunden zu tödlichem Botulismus.

II. S p o r e n g e w i n n u n g

Auf der Suche nach einem geeigneten Nährmedium wurde die Versporung in mehreren, von amerikanischen Autoren beschriebenen Nährböden untersucht. Neben drei flüssigen Nährmedien wurde ein fester, als Schrägagar verwendeter Nährboden geprüft.

1. H i t z m a n , H a l v o r s o n und U k i t a (1957, 63) beschreiben ein flüssiges Nährmedium, mit dem sie bei verschiedenen Anaeroben sehr gute Versporungsergebnisse erzielt hatten.

Zusammensetzung: Tryptisch verdautes Kasein (Tryptikase) 1,5 %

Glukose 0,2 %

NaCl 0,5 %

K_2HPO_4 0,25 %,

der pH-Endwert soll 7,2 betragen.

2. Flüssiges Nährmedium nach W y n n e und F o s t e r (1948, 153).

Zusammensetzung: Herz-Hirn-Bouillon (Difco) 3,7 %

Natriumthioglykollat 0,25 %

pH-Endwert 7,4

3. Flüssiges Nährmedium nach S u g i y a m a (1951, 132)

Zusammensetzung: Pankreatisch verdautes Kasein (Difco Casitone) 5 %

Difco Peptone 0,5 %

pH-Endwert 7,2

4. Festes Nährmedium nach T r e a d w e l l , J a n n und S a l l e (1958, 141).

Es hat dieselben Bestandteile wie das Nährmedium von S u g i y a m a (1951, 132), wurde jedoch durch 1,5 % Agarzusatz verfestigt. pH-Endwert 7.2.

Von den flüssigen Nährmedien wurden jeweils 10 ml in 8 Kulturröhrchen abgefüllt. Sämtliche Röhrchen wurden mit 0,1 ml einer drei Tage alten Leberbouillonkultur beimpft und in mehreren Anaerobenkulturtöpfen, die täglich evakuiert wurden, bei 35°C bebrütet. In fünftägigen Abständen, d.h. am 5., 10., 15. und 20. Tag wurden aus jeder Nährbodenserie zwei Röhrchen auf Versporung geprüft.
Die Schrägagarkulturen wurden durch 15 Minuten-Behandlung im Schüttelapparat mit 5 ml physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt. Sämtliche Kulturaufschwemmungen wurden durch sterile Watte filtriert, um grobe Verunreinigungen zu entfernen. Durch ausgiebiges Schütteln wurden die Keime gleichmäßig suspen-

diert. Danach wurde das Verhältnis der Sporenzahl zur Zahl der vegetativen Keime mit Hilfe der Thoma-Hellige-Zählkammer bestimmt.
Nach Ermittlung des Keimgehaltes und entsprechender Verdünnung der Kulturen wurden die vegetativen Keime durch halbstündiges Erhitzen auf 80°C abgetötet und die Keimfähigkeit der Sporen im Kulturverfahren geprüft.
Die Endergebnisse der Untersuchungen waren folgende:

Nährmedium nach	Maximale Versporung	Keimfähigkeit
1. Hitzman, Halvorson und Ukita (1957, 63)	40 % nach 20 Tagen	55 %
2. Wynne und Foster (1948, 153)	70 % nach 15 Tagen	60 %
3. Sugiyama (1951, 132)	85 % nach 10 Tagen	67 %
4. Treadwell, Jann und Salle (1958, 141)	90 % nach 10 Tagen	40 %

Wie vorstehende Tabelle zeigt, lieferte das Nährmedium nach S u g i y a m a (1951, 132) neben einer hohen Versporungsrate den höchsten Prozentsatz keimfähiger Sporen. Es wurde deshalb zur Sporenzüchtung verwendet.

III. Die Ermittlung der Sporenzahl / ml

Für die späteren Versuche war es wichtig, die Zahl der zur Infektion verwendeten Sporen möglichst genau zu kennen. In gleicher Weise wie die Versporung wurde die Dichte der Sporensuspensionen mit Hilfe der Thoma-Hellige-Kammer im Phasenkontrastverfahren bestimmt. Bei der speziell für die Mikrobenzählung angefertigten Zählkammer (0,01 mm) können sämtliche Sporen in einer Bildebene erfaßt werden.
Da die Originalsuspensionen wegen zu hoher Keimdichte beim Auszählen Schwierigkeiten bereiteten, wurden sie stets zehnfach mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, so daß auf ein Gruppenquadrat je nach der Dichte der Suspension

20-100 Keime entfielen. Bei größerer Dichte wurden die Suspensionen mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1:1 weiterverdünnt. Im allgemeinen wurden 8 Gruppenquadrate ausgezählt. Bei geringer Sporendichte wurde die ganze Kammer (16 Gruppenquadrate) durchgemustert. Stets wurden zwei Kammerfüllungen kontrolliert. Der Mittelwert beider Zählungen wurde schließlich der Berechnung der Sporenzahl / ml zugrunde gelegt.

IV. Prüfung der Keimfähigkeit

Da die mit Hilfe der Zählkammer ermittelte Gesamtzahl keinen Aufschluß über den Anteil der keimfähigen Sporen gibt, mußte der Prozentsatz der lebenden Sporen eigens bestimmt werden.
Burke (1923, 24) berichtet von einer färberischen Methode, die eine Unterscheidung lebender und toter Sporen ermöglicht. Danach färbt dampfendes Karbolfuchsin bei lebenden Sporen nur das Ektosporium, während abgestorbene Sporen durchgefärbt werden. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Methode für quantitative Bestimmungen unzuverlässig ist. Schon geringe Veränderungen der Färbezeit und noch mehr der Entfärbezeit verschoben das Verhältnis sehr stark nach der einen oder anderen Seite.
Zum direkten, kulturellen Nachweis der Keimfähigkeit der Sporen wurden zwei Agarmedien verwendet, die sehr rasch zuverlässige Ergebnisse lieferten.

1. Nährmedium nach Wynne, Schmieding und Daye (1955, 154)

Zusammensetzung:	Hefeextrakt (Yeast extract Difco)	1 %
	Natriumthioglykollat	0,05 %
	lösliche Stärke	0,1 %
	K_2HPO_4	0,2 %
	Agar	1,5 %

Vor dem Agarzusatz wird der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Die getrennte Sterilisation des K_2HPO_4 erhöht die Durchsichtigkeit des Nährmediums. Vor der Beimpfung wird dem Nährboden 0,1 % steriles $NaHCO_3$ als Puffer zugesetzt.

2. Nährmedium nach Treadwell, Jann und Salle (1958, 141).
Die Autoren berichten, daß Sporen von Clostridium botulinum in 5 % Hefe-

extrakt (Yeast extract Difco) mit einem Zusatz von 0,1 % $NaHCO_3$ und einem pH-Endwert von 6,8 innerhalb von 4 Stunden auskeimen.

Nach eigenen Erfahrungen machte ein weiterer Zusatz von 1,5 % Agar das flüssige Medium sehr gut zur Auszählung der keimfähigen Sporen geeignet. Die Nährmedien nach W y n n e , S c h m i e d i n g , D a y e und T r e a d w e l l , J a n n , S a l l e wurden in Mengen von 7 ml in Kulturröhrchen abgefüllt. Entsprechend den Angaben der Autoren wurden vor der Beimpfung jedem Röhrchen 0,3 ml einer seitzfiltrierten 2,5 % $NaHCO_3$-Lösung zugesetzt.
Die zu untersuchende Originalsuspension wurde nach Ermittlung der Sporenzahl in der Zählkammer in Zehnerpotenzen so weit verdünnt, bis sich der errechnete Keimgehalt pro ml des letzten Röhrchens in einer zweistelligen Zahl ausdrücken ließ. Somit enthielten z.B. die letzten drei Röhrchen einer Verdünnungsreihe pro ml die errechnete Zahl von 8000 bzw. 800 bzw. 80 Sporen. Durch halbstündiges Erhitzen der verdünnten Kultursuspensionen auf 80°C wurden die vegetativen Keime abgetötet. Damit wurde zugleich der von E v a n s und C u r r a n (1943, 45) beobachtete, die Sporenkeimung aktivierende Einfluß der Hitze ausgenützt. Aus jeder der drei letzten Verdünnungen wurden sechs Agarröhrchen mit jeweils 0,2 ml der Suspension beimpft (drei Medien nach dem von W y n n e , S c h m i e d i n g und D a y e angegebenen Rezept und drei nach dem modifizierten Rezept T r e a d w e l l s und seiner Mitarbeiter). Durch vorsichtiges Neigen und Rollen der Röhrchen zwischen den Handflächen wurde das Impfmaterial mit dem flüssigen Nähragar vermischt. Wenn sich bei der Durchmischung an der Oberfläche der beimpften Medien Luftblasen gebildet hatten, wurden diese mit der glühenden Öse zerstört. Danach wurden die Röhrchen sofort im kalten Wasser abgekühlt. Die erstarrten Nährböden wurden, um die anaeroben Bedingungen zu verbessern, mit einer 3 cm hohen Agarsäule (1,5 % Agar und 0,05 % Natriumthioglykollat) überschichtet und danach bei 35°C wie aerobe Kulturen bebrütet. Schon nach 6 Stunden wurden die ersten Kolonien sichtbar, nach spätestens 12 Stunden konnten sie mit dem bloßen Auge gezählt werden. In der Annahme, daß jede keimfähige Spore zur Bildung einer Kolonie geführt habe, wurde die durchschnittliche Kolonienzahl bestimmt und zur errechneten Gesamtzahl der Sporen in Beziehung gesetzt. Die Zahl der Kolonien in dem Nährmedium nach W y n n e , S c h m i e d i n g und D a y e war durchschnittlich um 10 % höher als in dem Hefeextraktagar. Dafür bildeten sich in letzterem größere Kolonien, die besonders in den schwach beimpften Röhrchen morphologische Vergleiche ermöglichten. In einem Fall betrug die Kolonienzahl (= Zahl der

keimungsfähigen Sporen) 72 % der errechneten Gesamtzahl. Dieser Prozentsatz kann als sehr hoch angesehen werden, wenn man die Fehlerquellen, die die Verdünnung der Suspensionen in sich birgt, berücksichtigt.
Da die stärker beimpften Agarmedien sehr bald durch Gasbildung zerrissen wurden, war es nicht möglich, ein weiteres Ansteigen der Kolonienzahlen durch nachträgliche Auskeimung festzustellen. Bei siebentägiger Beobachtung von schwach beimpften Agarmedien wurde jedoch keine Zunahme der Kolonienzahlen festgestellt.
Die Sporensuspensionen wurden, wie die Leberbouillonkulturen, bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. In einem Fall wurde die Keimfähigkeit einer Suspension sofort nach der Gewinnung und nach halbjähriger Aufbewahrung im Kühlschrank geprüft. Der Verlust der Keimfähigkeit nach dieser Zeit betrug nur 8 %.

V. Entgiftungsmethoden

Als Hauptgegenstand der Kritik bedurfte die Entgiftung des Infektionsmaterials einer besonders sorgfältigen Überprüfung. Infolge der engen Verknüpfung des Entgiftungsproblems mit der Frage der Infektiosität von Cl. bot., sollen die diesbezüglichen Untersuchungen im Zusammenhang mit den Infektionsversuchen dargestellt werden. Hier seien nur die Techniken erläutert, ohne auf ihre jeweilige Zuverlässigkeit einzugehen.

1. Die Vorbehandlung der Kulturen durch Waschen.

In der Absicht, die Keime von Nährstoffen und Toxinen zu befreien, wurden stark versporte Kulturen durch sterile Watte filtriert und bei 4°C 30 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nach Dekanthieren des Überstandes wurden die sedimentierten Keime in 10 ml physiologischer NaCl-Lösung erneut aufgeschwemmt und abermals zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt.

2. Die Vorbehandlung durch Erhitzen.

Die durch sterile Watte filtrierten Kulturen wurden kurz vor der Verwendung im Wasserbad 30 Min. lang auf 80°C erhitzt. Nach allgemeiner Erfahrung werden dabei vegetative Keime sicher abgetötet und freies Toxin vernichtet.

3. Die Vorbehandlung der Kulturen durch mehrmaliges Waschen und Erhitzen vor der Verwendung.

Die Keimfähigkeit der Sporen wurde durch die oben angeführten Entgiftungstechniken nur geringfügig beeinflußt.

VI. Versuchstiere, Infektionsmodus und Erregernachweis

Zur künstlichen Infektion dienten weiße Mäuse und Meerschweinchen beiderlei Geschlechtes, sowie ein 2 1/2 Jahre alter Hammel.
Die Injektion der entgifteten Sporensuspensionen und der infektionsbegünstigenden Stoffe erfolgte bei Mäusen und Meerschweinchen nach Enthaarung der Injektionsstelle in die Muskulatur des linken Oberschenkels. Bei Mäusen wurden maximal 0,2 ml, bei Meerschweinchen 1,0 ml i.m. injiziert.

Die postmortale Untersuchung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden, sobald sie deutliche Botulismussymptome zeigten, mit Äther getötet und seziert. Die Sektion der verendeten Tiere erfolgte so früh wie möglich nach dem Tode. Es wurde stets versucht, den Erreger direkt in Abstrichen aus der veränderten Muskulatur nachzuweisen. K a l i c h (1957, 70) hat durch Modifizierung der Rakettefärbung eine Färbemethode entwickelt, die neben der deutlichen Hervorhebung der Sporen besonders die Phagozytentätigkeit anschaulich macht.
Die luftgetrockneten Ausstriche werden 2 Minuten lang mit Methylalkohol fixiert. Anschließend werden sie in 5%iger Malachitgrünlösung bei 56°C 7 Minuten lang gefärbt. Danach erfolgt die Gegenfärbung mit 3%iger Safraninlösung 10 Sekunden lang.
Neben der eben genannten Methode wurde das Wundsekret in gramgefärbten Ausstrichen und im Nativpräparat im Phasenkontrastverfahren untersucht.

Der kulturelle Erregernachweis

Zum kulturellen Nachweis des Erregers wurden die Organe der sezierten Tiere unter sterilen Bedingungen einzeln auf Leberbouillonröhrchen verimpft. Stets wurden folgende Organe untersucht: Milz, Leber, Niere, Herzblut, Gehirn, die unveränderte und die pathologisch veränderte Muskulatur. Nach zweitägiger Bebrütung wurden von sämtlichen Leberbouillonröhrchen, auch wenn ihr Inhalt nicht sichtbar verdaut oder mikroskopisch keimfrei war, Blutplatten beimpft

und aerob und anaerob bebrütet. Nach der Beimpfung der Blutplatten wurden die Röhrchen, in denen die Leberbouillon nicht verdaut war, weiterbebrütet. Die Röhrchen, die Verdauung zeigten, wurden dagegen im Kühlschrank aufbewahrt.
Nach zweitägiger Bebrütung wurde das Wachstum auf den Blutplatten untersucht. Mit Hilfe des Plattenmikroskopes wurden botulinusverdächtige Kolonien isoliert und auf Leberbouillon verimpft. Sofern die aerob bebrüteten Platten bewachsen waren oder andere Keimgattungen auf den anaerob bebrüteten Blutplatten durch massives Wachstum die Isolierung von Clostridien unmöglich machten, wurden die zugehörigen Leberbouillonkulturen zeitlich abgestuft auf 80°C erhitzt und anschließend auf mehrere Leberbouillonröhrchen überimpft. Falls in einem dieser Medien nach 48stündiger Bebrütung Wachstum sichtbar war, wurden daraus erneut Blutplatten beimpft. Oft gelang die Reinzüchtung erst nach mehreren Passagen von Leberbouillon auf Blut.

Die bakteriologische Diagnose mit Hilfe des Tierversuches

Der endgültige Beweis für die Isolierung von Cl. bot. konnte im Tierversuch erbracht werden. Zu diesem Zweck wurde 2 Mäusen je 0,5 ml des Überstandes einer dreitägigen Leberbouillonkultur i.p. injiziert. Im positiven Fall starben die Versuchstiere innerhalb von 20 Stunden an Botulismus (schlaffe Lähmungen, Atemnot und wespentaillenartige Einziehung der seitlichen Bauchdecken).

In einzelnen Fällen wurde der Erregernachweis im komplizierten Tierversuch gesichert. Zu diesem Zweck wurden 18 Mäuse mit je 0,5 ml stammspezifischem, an Aluminiumhydroxyd adsorbiertem, formolinaktiviertem Toxoid aktiv immunisiert. Nach 30 Tagen besaßen die Tiere ausreichenden Schutz zur Durchführung der Versuche.

B. Die Ergebnisse der Infektionsversuche

I. Die Prüfung der Entgiftungsmethoden

In Anbetracht der hohen Toxizität von Cl. bot. beruht die Beweiskraft aller Infektionsversuche auf dem sicheren Nachweis der Entgiftung des Infektionsmaterials. Es konnte deshalb bei den eigenen Versuchen nicht auf eine Kontrolle der im Schrifttum mitgeteilten Entgiftungsmethoden verzichtet werden.

Die meisten Autoren haben die zur Infektion verwendeten Sporenkulturen durch wiederholtes Waschen und Erhitzen vorbehandelt. Beide Verfahren wurden auf ihre Zuverlässigkeit geprüft.

1. Entgiftung der Sporenkulturen durch Waschen

a) Toxizitätsvergleich zwischen Botulinuskulturen und keimfreien Überständen nach mehrmaligen Waschungen:

Tierversuch 1

Die Frage, ob durch indirekte Kontrollen, wie z.B. die Untersuchung der keimfreien Waschflüssigkeit, der Beweis für eine Entgiftung der gewaschenen Botulinuskulturen erbracht werden kann, bedurfte der Prüfung. Jeder Versuch, der darauf ausgerichtet ist, den direkten Beweis für die Entgiftung durch die Prüfung der Kultur zu erbringen, muß notgedrungen die Möglichkeit infektiöser Einflüsse berücksichtigen.
Neben der Prüfung der allgemeinen Frage, ob eine Kultur durch wiederholtes Waschen für Versuchstiere unschädlich gemacht werden kann, sollte durch den Vergleich der keimfreien Waschflüssigkeit mit der Kulturaufschwemmung der Versuch gemacht werden, neben der Toxinwirkung mögliche infektiöse Einflüsse aufzudecken.
Zu diesem Zweck wurden aus einer 14 Tage alten, zu 82 % versporten Kultur jeweils 5 ml in 9 Zentrifugengläser pipettiert. Die Suspensionen der einzelnen Röhrchen wurden durch Zentrifugieren und erneutes Aufschwemmen in jeweils 10 ml physiologischer NaCl Lösung verschieden oft (1-8 mal) gewaschen. Von jedem Röhrchen wurden die aufgeschwemmte Kultur und der keimfreie Überstand auf Toxizität geprüft. Dazu wurden 3 Mäusen je 0,5 ml der Aufschwemmung (80 Millionen Keime), 3 weiteren Mäusen jeweils 0,5 ml des Überstandes i.p. injiziert. S. Tabelle 1.
Durch den Versuch konnte bewiesen werden, daß eine Entgiftung der Sporenkulturen durch Waschen grundsätzlich möglich ist. Sie bedarf jedoch sorgfältiger und aufwendiger Kontrollen. Ein Vergleich der Suspension mit der Waschflüssigkeit zeigt, daß die Toxizität der Keimaufschwemmung länger erhalten bleibt. So verursachte die Keimsuspension noch nach fünfmaliger Aufschwemmung den Tod sämtlicher Mäuse, während die zugehörige keimfreie Waschflüssigkeit atoxisch war. Von den mit dem Überstand der vierten Aufschwemmung gespritzten Mäusen starben nur zwei an Botulismus. Das 3. Tier blieb völlig gesund, obwohl es die über Nacht gestorbenen Käfiggenossen angenagt hatte.

Nichts deutete auf einen infektiösen Einfluß der gewaschenen Kulturen hin. Die mit der Keimsuspension infizierten Mäuse zeigten keine lokale

Tabelle 1

Tierversuch 1

Die Entgiftung einer versporten Kultur von Cl. bot. durch Waschen. Vergleich der Toxizität von Keimsuspension (160 Mill./ml) und keimfreiem Überstand nach wiederholter Waschbehandlung.

	Keimsuspension 0,5 ml i. p.			Keimfreier Überstand 0,5 ml i. p.		
	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 1	Maus 2	Maus 3
Kultur	+	+	+	+	+	+
1. Waschung	+	+	+	+	+	+
2. Waschung	+	+	+	+	+	+
3. Waschung	+	+	+	+	+	+
4. Waschung	+	+	+	+	+	-
5. Waschung	+	+	+	-	-	-
6. Waschung	-	-	-	-	-	-
7. Waschung	-	-	-	-	-	-
8. Waschung	-	-	-	-	-	-

Der Tod der an Botulismus erkrankten Mäuse trat spätestens nach 48 Stunden ein.

Reaktion. Makroskopisch zeigten beide Versuchsgruppen dieselben pathologisch-anatomischen Veränderungen: Allgemeine Stase in den Organen und pralle Füllung des Darmes und der Blase. In Ausstrichen der Peritonealflüssigkeit, die nach der von K a l i c h (1957,70) angegebenen Methode gefärbt wurden, konnten zahlreiche segmentkernige Leukozyten mit phagozytierten Sporen

nachgewiesen werden. Obwohl die injizierte Kultur etwa zu 1/5 vegetative Keime enthielt, konnten solche nur sehr vereinzelt in den Leukozyten festgestellt werden.

b) Die Toxinnachbildung in gewaschenen Sporenkulturen:

Tierversuch 2

Zur weiteren Kontrolle wurden die als giftfrei befundenen, gewaschenen Kulturen 8 Wochen lang bei 4°C aufbewahrt. Danach wurde die Toxizität der Kulturen wie im ersten Versuch geprüft.

Tabelle 2

Die Toxinnachbildung in durch Waschen entgifteten Sporenkulturen von Cl. bot. Typ B, nach achtwöchiger Aufbewahrung bei 4°C.
Vergleich der Toxizität von keimfreiem Überstand und Keimsuspension.

	Keimsuspension 0,5 ml i. p.			Keimfreier Überstand 0, 5 ml i. p.		
	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 1	Maus 2	Maus 3
6. Waschung	+	+	+	+	+	+
7. Waschung	+	+	+	+	+	-
8. Waschung	+	+	+	+	+	-

Innerhalb von 28 Stunden starben sämtliche Versuchstiere an Botulismus.

Der Versuch zeigte, daß in Kulturen, denen durch die Waschungen und die Aufbewahrung bei 4°C jede Möglichkeit zum Wachstum genommen war, dennoch so viel Toxin nachgebildet wurde, daß Mäuse nach der i.p. Injektion von 0,5 ml innerhalb von 28 Stunden an Botulismus verendeten.

c) Die Toxinnachbildung in einer versporten und einer unversporten Kultur:

Tierversuch 3

Um die Herkunft des Toxins näher zu bestimmen, wurden eine junge Kultur und eine zu 85 % versporte Kultur achtmal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen.

Die Unschädlichkeit der Kulturen nach den Waschungen konnte durch i. p. Verabreichung von je 0,5 ml an 4 Mäuse bewiesen werden. Durch die Verdünnung der jungen Kultur mit physiologischer NaCl-Lösung wurden zwei Suspensionen gleicher Dichte hergestellt (310 Mill. Keime / ml). Beide Kulturen wurden bei 4°C 8 Wochen lang im Kühlschrank aufbewahrt. In einem orientierenden Vorversuch wurde die Toxizität der Kulturen an Mäusen geprüft. Bei hundertfacher Verdünnung waren die Überstände beider Kulturen in Mengen von 0,5 ml toxinfrei, während bei zehnfacher Verdünnung 3 von 4 Tieren starben. Danach wurde eine fortlaufende Verdünnungsreihe angelegt. Von jeder Verdünnung wurden 2 Mäusen jeweils 0,5 ml i.p. injiziert.

Tabelle 3

Tierversuch 3

Toxizitätsvergleich zwischen einer durch Waschen entgifteten Sporenkultur und einer unversporten Kultur nach achtwöchiger Aufbewahrung bei 4°C. Keimdichte beider Kulturen 310 Millionen / ml.

	Versporung 85 % Überstand 0,5 ml i.p.		Versporung < 5% Überstand 0,5 ml i. p.	
Verdünnung	Maus 1	Maus 2	Maus 1	Maus 2
0	+	+	+	+
1:5	+	+	+	+
1:10	+	-	+	+
1:20	-	-	+	+
1:40	-	-	+	+
1:80	-	-	-	-

Der Tod der an Botulismus erkrankten Tiere trat spätestens nach 48 Stunden ein.

Das Ergebnis zeigt, daß bei gleicher Dichte der Suspensionen die Toxinnachbildung in der unversporten Kultur etwa um das Vierfache stärker war als in der Sporenkultur. Daraus konnte geschlossen werden, daß hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich, vegetative Keime für die Toxinnachbildung verantwortlich waren.

2. Die Entgiftung der Kulturen durch Erhitzen

Tierversuch 4

Eine zu 75 % versporte Kultur mit einer Keimdichte von 260 Millionen pro ml wurde 30 Minuten lang auf 80°C erhitzt. 6 Mäusen wurden jeweils 0,5 ml der Kultur (130 Mill. Keime) i. p. injiziert. Alle Mäuse blieben am Leben. Die Injektion des nicht erhitzten Kulturüberstandes führte dagegen bei einem Kontrolltier nach 18 Stunden zu tödlichem Botulismus.
In den durch Erhitzen entgifteten Kulturen konnte im Gegensatz zu den gewaschenen Kulturen nach achtwöchiger Aufbewahrung keine Toxinbildung nachgewiesen werden. Die Versuche beweisen die absolute Zuverlässigkeit der Erhitzungsmethode. Daneben wurde die Waschmethode beibehalten, um die Sporensuspensionen von Nährstoffen zu befreien.

II. Infektionsversuche mit gewaschenen und erhitzten Sporen von Cl. bot. Typ B, Cl. novyi und Cl. septicum ohne Adjuvans

Tierversuch 5

Die vorhergehenden Versuche haben ergeben, daß 80 bzw. 130 Millionen entgiftete Sporen des verwendeten Typ B-Stammes bei Mäusen nach i. p. Injektion keinen Botulismus hervorrufen konnten.
Tulloch (1918, 142), Bullock und Cramer (1919, 22), Teale und Bach (1919-1920, 136) u.a. haben in Versuchen mit Cl. tetani, Cl. perfringens, Cl. septicum und Cl. novyi festgestellt, daß mit der Entgiftung dieser Keime ihre infektiösen Eigenschaften verlorengehen. Auf Grund der Gattungszugehörigkeit lag es nahe, die mit anderen Clostridien gemachten Erfahrungen auch auf Cl. bot. anzuwenden.
Zur Bestätigung, daß die Entgiftung im Hinblick auf die Infektiosität einen schweren Eingriff darstellt, wurden in einem vergleichenden Versuch Mäuse mit

gewaschenen und erhitzten Sporen von Cl. novyi, Cl. septicum und Cl. bot. infiziert.
Die Keimfähigkeit der verwendeten Sporen nach der Erhitzung betrug bei Cl. bot. 64 %, bei Cl. novyi 55 % und bei Cl. septicum 48 %. Der bei Cl. septicum beobachtete niedrige Prozentsatz keimfähiger Sporen konnte auf ungünstige Kulturbedingungen zurückgeführt werden.
Da zur Infektion sehr große Sporenzahlen verwendet wurden, durfte dieser Mangel unberücksichtigt bleiben.

Tabelle 4

Tierversuch 5

Die Infektiosität gewaschener und erhitzter Sporen:
Vergleich von Cl. bot. Typ B mit Cl. novyi und Cl. septicum. Die Versuchstiere (weiße Mäuse) erhielten je 0,1 ml Sporensuspension i.m.

	Verdünnung	Sporen in 0,1 ml	Maus 1	Maus 2	Maus 3
Cl. bot. Typ B	0	44 Millionen	-	-	-
	1 : 10	4,4 "	-	-	-
	1 : 100	440 000	-	-	-
Cl. novyi	0	62 Millionen	-	-	-
	1 : 10	6,2 "	-	-	-
	1 : 100	620 000	-	-	-
Cl. septicum	0	65 Millionen	-	-	-
	1 : 10	6,5 "	-	-	-
	1 : 100	650 000	-	-	-

Sämtliche Versuchstiere blieben am Leben.

Kontrolle: nicht erhitzte Sporenkultur 0,5 ml i. p.	Maus 1	Maus 2
Cl. bot. Typ B	+ 20h	+ 20 h
Cl. novyi	+ 20h	+ 20 h
Cl. septicum	+ 20h	+ 20 h

Die in der Tabelle zusammengestellten Versuche lassen erkennen, daß alle Tiere, die mit entgifteten Sporen infiziert wurden, am Leben blieben, während die Kontrolltiere, die mit den nicht erhitzten Sporenkulturen infiziert wurden, innerhalb von 20 Stunden verendeten.

III. Infektionsversuche mit entgifteten Sporen von Cl. bot. Typ B, unter Verwendung kataphylaktischer Substanzen

Bullock und Cramer (1919, 22) und Teale und Bach (1919-1920, 136) fanden, daß die infektiösen Eigenschaften von Cl. tetani, Cl. perfringens, Cl. septicum und Cl. novyi nicht von der spezifischen Wirkung arteigener Toxine abhängig sind, sondern durch eine Vielzahl schädigender Einflüsse mechanischer, bakterieller oder chemischer Art geweckt werden können. Wie schon berichtet, haben sich Edmondson, Giltner und Thom (1920, 42), Coleman (1929, 28) und Keppie (1951, 74) bei Infektionsversuchen mit Cl. bot. Typ A mit Erfolg schädigender Stoffe bedient.
In den folgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob gewebeschädigende Substanzen eine Infektion mit Cl. bot. Typ B begünstigen.

1. Schädigung der Muskulatur durch $CaCl_2$-Lösung

Jeder Tierarzt kennt die bösartigen Folgen der paravenösen $CaCl_2$-Injektion. Durch die Auflockerung der Gewebe begünstigt das $CaCl_2$ besonders Infektionen mit Clostridien, (Teale und Bach (1919-1920, 136), Taylor (1954, 135), Zeissler, Krauspe, Rassfeld-Sternberg (1958, 156)).
Edmondson, Giltner und Thom (1920, 42) und Keppie (1951, 74) gelang es mit Hilfe von $CaCl_2$ Mäuse und Meerschweinchen künstlich mit Cl. bot. Typ A zu infizieren.

a) Die Injektion entgifteter Botulinussporen mit $CaCl_2$-Lösung bei Mäusen:

Tierversuch 6

In dem folgenden Versuch wurde eine frisch bereitete, sechsmal gewaschene Sporensuspension mit einer Keimdichte von 75 Millionen/ml in Zehnerpotenzen verdünnt und kurz vor der Injektion 30 Minuten lang auf 80°C erhitzt. Von jeder Verdünnung wurden drei Mäusen je 0,1 ml der Sporensuspension zusammen mit 0,1 ml 3%iger steriler $CaCl_2$-Lösung i.m. injiziert.

Tabelle 5

Tierversuch 6

Die i.m. Injektion entgifteter Botulinussporen mit 3%iger $CaCl_2$-Lösung bei Mäusen.

Verdünnung	Sporen in 0,1 ml	3% $CaCl_2$	Maus 1	Maus 2	Maus 3
0	7,5 Millionen	0,1	4 Tage + alle Organe^{x}	6 Tage + alle Organe	-
10^{-1}	750 000	0,1	(+) 16 Tage Milz, Muskulatur	-	-
10^{-2}	75 000	0,1	-	-	-
10^{-3}	7 500	0,1	(+) 11 Tage Milz, Muskulatur	(+) 6 Tage Milz, Muskulatur	-
10^{-4}	750	0,1	-	-	-
10^{-5}	75	0,1	(+) 13 Tage Milz, Muskulatur	-	-
Kontrolle:	Kulturüberstand nicht erhitzt 0,5 ml i.p.		+ 20^{h}	+ 20^{h}	+ 20^{h}

\+ an Botulismus gestorben

(+) mit schweren Botulismussymptomen getötet

x in den aufgeführten Organen wurde Cl. bot. nachgewiesen

Der Versuch wurde am 21. Tag abgebrochen. Wie die Tabelle 5 zeigt, erkrankten 6 von 18 infizierten Mäusen vom 4.-16. Tag an Botulismus. 2 Mäuse, die mit 7,5 Millionen Sporen infiziert worden waren, starben über Nacht, ohne daß Botulismussymptome beobachtet wurden. In sämtlichen untersuchten Organen dieser Tiere konnte Cl. bot. nachgewiesen werden. Die übrigen 4 Mäuse zeigten wenige Stunden nach dem Auftreten einer mit Lahmheit verbundenen, anfangs schmerzhaften Schwellung der infizierten Extremität deutliche Botulismussymptome. Sie wurden in der Agonie mit Äther getötet und sofort seziert. Neben dem allgemeinen bei Botulismus üblichen pathologisch-anatomischen Befund wurden folgende lokale Veränderungen beobachtet:
Die haarlose Injektionsstelle war stets von einem dunkelbraunen, schildartigen Schorf mit unterminierten Rändern bedeckt. Nach Abheben dieses harten Schorfes wurde ein blasses, feuchtes, bläulich schimmerndes Wundgewebe sichtbar. Das Unterhautgewebe des Oberschenkels zeigte stets ein klares, nicht hämorrhagisches Ödem, das sich in zwei Fällen im Inguinalbereich bis auf die Bauchhaut ausdehnte. Die Oberfläche der Muskulatur war von einem schmierigen, gelben oder ockerfarbenen Belag bedeckt. Unter der veränderten Muskeloberfläche war ein schmaler, grauer Demarkationswall sichtbar. In der Tiefe war das Muskelgewebe trocken, hellrosa mit sehr feinen, weißen, streifenförmig angeordneten Stippchen durchsetzt. Im Infektionsgebiet konnte keine Gasbildung nachgewiesen werden.
Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Gefrierschnitte zeigten neben der schon beobachteten Leukozytose in der Muskulatur einen scholligen Zerfall einzelner Muskelfasern (Zenkersche Degeneration), eine histiozytäre Infiltration des intermuskulären Bindegewebes und Proliferation der Sarkolemmkerne. Daneben wurden auffallend viele eosinophile Granulozyten beobachtet. Diese Veränderungen der Muskulatur waren, wie spätere Vergleiche zeigten, allein durch die $CaCl_2$-Injektion bedingt. Sie stellten also keinen spezifischen Befund dar.
Nach Giemsa gefärbte Gefrierschnitte zeigten eine starke leukozytäre Infiltration des Unterhautgewebes und zahlreiche phagozytierte Stäbchen. Daneben lagen die Stäbchen oft frei in dichter Ansammlung im Gewebe. In keinem Fall wurden die Stäbchen in der Muskulatur angetroffen.
In Ausstrichen, die nach der von K a l i c h (1957, 70) modifizierten Rakettefärbung gefärbt waren, konnten keine Sporen nachgewiesen werden. Das übrige Bild glich dem bei der Giemsafärbung festgestellten Befund.
Nativpräparate zeigten im Phasenkontrastbild zahlreiche, große, lebhaft bewegliche Stäbchen. Diese färbten sich grampositiv. Daneben fanden sich stets Mikrokokken, in einzelnen Präparaten Streptokokken und feine, pleomorphe gramnegative Stäbchen.

Der Erregernachweis bei den vier getöteten Mäusen gelang nur aus der veränderten Muskulatur und aus der Milz. Auffallend an dem Versuch war die ungleiche Verteilung der Todesfälle, sowohl in Bezug auf die Infektionsdosis als auch im Hinblick auf das zeitliche Auftreten. So zeigte sich z.B., daß eine Maus, der 75 Sporen injiziert worden waren, an Botulismus erkrankte, während eine andere Maus, der 7,5 Millionen Sporen injiziert worden waren, am Leben blieb. Eine weitere Maus, der 7500 Sporen injiziert worden waren, starb am 6. Tag, während eine Maus, die 750 000 Sporen erhalten hatte, erst am 16. Tag verendete.

b) Die Injektion entgifteter Botulinussporen mit $CaCl_2$-Lösung bei Meerschweinchen:

Tierversuch 7

Neben dem Tierversuch mit Mäusen wurde der infektionsbegünstigende Effekt des $CaCl_2$ auch an 10 Meerschweinchen geprüft.
Zu diesem Zweck wurden gewaschene Sporensuspensionen in Zehnerpotenzen verdünnt und 30 Minuten lang auf 80°C erhitzt. Von jeder Verdünnung wurden 2 Meerschweinchen jeweils 0,5 ml Suspension und 0,5 ml 3%ige sterile $CaCl_2$-Lösung i.m. injiziert. Die höchste injizierte Sporenzahl betrug 6 Millionen, die niedrigste 600. S. Tabelle 6.
Von 10 Meerschweinchen erkrankten 9 an Botulismus. Davon starben 4 Tiere nach 2, je 2 Tiere nach 3 und 4 Tagen und 1 Meerschweinchen nach 8 Tagen. Nach der Inkubation nahm die Erkrankung stets einen perakuten Verlauf. In den beobachteten Fällen verstrichen vom Sichtbarwerden der ersten Symptome bis zum Eintritt des Todes nie mehr als 4 Stunden. Die Tiere lagen matt mit ausgestreckten Gliedern und erschlafften Bauchdecken da. Neben der schweren Atemnot fiel stets die überaus starke Speichelsekretion auf. Mehrere Tiere hatten Futterwickel im Maul. Bei einzelnen Meerschweinchen war die Tränensekretion sehr stark vermehrt. Bei anderen dagegen waren die Konjunktiven und die Kornea völlig trocken. Es zeigten sich graue Korneatrübungen und Epitheldefekte. Bei 4 Meerschweinchen wurde eine Harninkontinenz beobachtet.
Die infizierte Extremität war in jedem Fall sehr stark ödematös und völlig gelähmt. Sie hatte oft den dreifachen Umfang der gesunden Extremität. In einem Fall erstreckte sich die Schwellung bis in den Nabelbereich. 3 Tiere wurden in der Agonie mit Äther getötet. 2 Meerschweinchen, die über Nacht verendet waren, wurden erst mehrere Stunden nach dem Tode seziert.
Neben der allgemeinen Hyperämie der Bauchorgane und einem starken Lungen-

Tabelle 6

Tierversuch 7

Die i.m. Injektion entgifteter Botulinussporen mit 3%iger $CaCl_2$-Lösung bei Meerschweinchen.

Meerschweinchen	injizierte Sporenzahl in 0,5 ml	3 % $CaCl_2$	Tod durch Botulismus			positive Organbefunde
1	6 Millionen	0,5 ml	(+)	4 Tage	7^h	Leber, Niere, Milz, veränderte und unveränderte Muskulatur, Sektion erst 14 Std. nach Töten!
2	6 Millionen	0,5 ml	+		42^h	veränderte Muskulatur
3	600 000	0,5 ml	+		46^h	veränderte und unveränderte Muskulatur
4	600 000	0,5 ml	+		43^h	veränderte Muskulatur
5	60 000	0,5 ml	+		46^h	veränderte Muskulatur
6	60 000	0,5 ml	+		72^h	veränderte Muskulatur
7	6 000	0,5 ml	+	4 Tage	1^h	veränderte Muskulatur
8	6 000	0,5 ml	(+)	8 Tage	4^h	veränderte Muskulatur, Leber und Milz, Sektion 14 Std. nach Töten!
9	600	0,5 ml	-	-	-	-
10	600	0,5 ml	+		70^h	veränderte Muskulatur

\+ an Botulismus gestorben (+) mit schweren Botulismussymptomen getötet

ödem wurde stets eine sehr starke Anschoppung des Coecums beobachtet. Die Gallenblase war stets prall gefüllt (fast kirschgroß), während die Harnblase nur in einem Fall bis zu Pflaumengröße gestaut war. Auffallend war bei allen Tieren eine follikuläre Milzhyperplasie. Die Leber war in 5 Fällen hell und brüchig, während sie bei den anderen Tieren dunkelviolett in Erscheinung trat.

Lokal war die Haut im Aussehen stets unverändert, infolge des starken Unterhautödems jedoch nicht abhebbar. Das Unterhautödem war glasklar bis bernsteingelb durchsichtig, von zahlreichen sehr feinen Bläschen durchsetzt. Die ödematöse Schwellung war im Inguinalbereich stets besonders ausgeprägt. Die infizierte Muskulatur war an der Oberfläche sehr blaß, feucht und aufgelockert. Beim Einschneiden in die Tiefe entwich stets geräuschvoll Gas, das eine gelbe, ockerfarbene oder rostrote Flüssigkeit aus dem Einschnitt herauspreßte. Eine erbsengroße, übelriechende Wundhöhle war von dem umgebenden Muskelgewebe durch einen weißen Wall abgeschlossen. Das weiter entfernte Muskelgewebe war dunkelrot und trocken. Dazwischen lagen scharf abgegrenzte, blasse, stark aufgelockerte Bezirke.

In Ausstrichen aus der veränderten Muskulatur, die nach der modifizierten Rakettefärbung gefärbt waren, wurden zahlreiche phagozytierte Stäbchen festgestellt, aber keine Sporen. In der Ödemflüssigkeit aus den entfernteren Bezirken konnten nur sehr wenig Stäbchen festgestellt werden, dagegen fanden sich in 3 Fällen zahlreiche Mikrokokken.

Die Stäbchen zeigten sich im Nativpräparat bei Phasenkontrastbetrachtung sehr beweglich. Daneben bildeten sie lange Fäden und vereinzelt auch geblähte Formen.

Sie färbten sich grampositiv. In keinem der Präparate konnten Sporen entdeckt werden. Außer diesen Keimen wurden Streptokokken, Mikrokokken und anhämolytische Kolikeime festgestellt.

Bei 7 Meerschweinchen gelang der kulturelle Erregernachweis nur aus der Muskulatur. Bei einem Meerschweinchen, das mit 6 Millionen Sporen infiziert worden war, konnte die Sektion erst mehrere Stunden nach dem Tod durchgeführt werden. Bis auf das Herzblut konnte aus sämtlichen untersuchten Organen Cl. bot. Typ B nachgewiesen werden. Bei einem weiteren, mit 6000 Sporen infizierten Meerschweinchen, das erst 14 Stunden nach dem Tode seziert wurde, konnte der Erreger aus der erkrankten Muskulatur und aus der Leber und Milz gezüchtet werden. In einem Fall gelang der Erregernachweis neben der veränderten Muskulatur auch aus der gesunden Muskulatur, obwohl alle übrigen Organe negativ waren.

In jedem Fall konnten die isolierten Erreger im komplizierten Tierversuch einwandfrei als Cl. bot. Typ B identifiziert werden.

c) Die Aktivierung einer latenten Infektion mit entgifteten Sporen durch nachträgliche Gewebsschädigung mit $CaCl_2$:

Tierversuch 8/9

Taylor (1954, 135) konnte durch nachträgliche $CaCl_2$-Injektion bei Mäusen, die mit entgifteten Sporen von Cl. septicum latent infiziert waren, noch nach 60 Tagen malignes Ödem erzeugen.

Tierversuch 8

Durch eine nachträgliche $CaCl_2$-Schädigung am Ort der Sporeninjektion wurde versucht, latente Sporeninfektionen mit Cl. bot., Cl. novyi und Cl. septicum zu aktivieren.
Wie berichtet blieben sämtliche Mäuse eines Tierversuches, die mit großen Mengen entgifteter Sporen der oben genannten Keimarten infiziert worden waren, am Leben, (siehe Tabelle 4). Denselben Tieren wurde nach 18 Tagen an der im Vorversuch durch Enthaarung gekennzeichneten Injektionsstelle jeweils 0,1 ml 3%ige $CaCl_2$-Lösung i.m. injiziert.
Nach weiteren 21 Tagen wurde der Versuch abgebrochen. Wie die tabellarische Zusammenfassung zeigt, rief die nachträgliche Schädigung bei den mit Botulinussporen infizierten Mäusen keinen Botulismus hervor, während nahezu alle mit Cl. novyi und Cl. septicum infizierten Mäuse starben. S. Tabelle 7.

Tierversuch 9 S. Tabelle 8.

Um zu prüfen, wie lange die Botulinussporen am Ort der Injektion verbleiben, wurden die Tiere einer Versuchsgruppe 6 Stunden, die einer zweiten 24 Stunden nach der Sporeninjektion durch 0,1 ml sterile 3%ige $CaCl_2$-Lösung geschädigt. Wie der Vergleich zeigt, starben von 12 Mäusen der Gruppe A 7 Tiere, während von der Gruppe B nur 2 Mäuse an Botulismus erkrankten, die mit der höchsten Sporenzahl (22 Millionen) infiziert waren. Der pathologisch-anatomische Befund glich dem im Tierversuch 6 beschriebenen.

Tabelle 7

Tierversuch 8

Die Aktivierung einer latenten Infektion mit Cl. bot., Cl. novyi und Cl. septicum durch nachträgliche Gewebeschädigung mit 3% $CaCl_2$-Lösung nach 18 Tagen.

	Verdünnung	Sporen in 0,1 ml	nach 18 Tagen 0,1 ml 3 % $CaCl_2$	Maus 1	Maus 2	Maus 3
Cl. bot. Typ B	0	44 Millionen	0,1 ml	-	-	-
	1:10	4,4 "	0,1	-	-	-
	1:100	440 000	0,1	-	-	-
Cl. novyi	0	62 Millionen	0,1	+ 3 Tage	+ 3 Tage	+ 3 Tage
	1:10	6,2 "	0,1	+ 2 Tage	+ 3 Tage	+ 5 Tage
	1:100	620 000	0,1	+ 3 Tage	+ 9 Tage	lebend
Cl. septicum	0	65 Millionen	0,1	+ 4 Tage	+ 5 Tage	+ 5 Tage
	1:10	6,5 "	0,1	+ 3 Tage	+ 4 Tage	lebend
	1:100	650 000	0,1	+ 6 Tage	+ 7 Tage	+ 7 Tage

Die mit Botulinussporen infizierten Mäuse blieben alle am Leben.

Kontrolle der Kulturen siehe Tabelle 4, Tierversuch 5.

Tabelle 8

Tierversuch 9

Schädigung der Muskulatur mit 0,1 ml 3% $CaCl_2$-Lösung 6 bzw. 24 Stunden nach der Injektion entgifteter Sporen von Cl. bot. Typ B. Versuchstiere: weiße Mäuse.

		Gruppe A nach 6 Stunden 0,1 ml 3%$CaCl_2$		Gruppe B nach 24 Stunden 0,1 ml $CaCl_2$	
Verdünnung	Sporen in 0,1 ml	Maus 1	Maus 2	Maus 1	Maus 2
0	22 Millionen	3 Tage + Leber, Milz, Muskulatur	4 Tage + alle Organe	4 Tage (+) Milz, Muskulatur	5 Tage + Milz, Muskulatur
10^{-1}	2,2 "	6 Tage (+) Milz, Muskulatur	-	-	-
10^{-2}	220 000	20^h XX + alle Organe	-	-	-
10^{-3}	22 000	-	-	-	-
10^{-4}	2 200	6 Tage (+) Milz, Muskulatur	11 Tage + Muskulatur Leber, Milz, Niere, Hirn	-	-
10^{-5}	220	6 Tage + Milz, Muskulatur	-	-	-
Kontrolle: Kulturüberstand nicht erhitzt 0,5 ml i.p.				$+ 18^h$	$+ 18^h$

\+ an Botulismus gestorben (+) mit schweren Botulismussymptomen getötet

xx Tod durch Botulismus fraglich, bei dem betreffenden Tier ist über Nacht die Wasserflasche ausgelaufen.

d) Die örtlich getrennte Injektion von Botulinussporen und $CaCl_2$-Lösung:

Tierversuch 10 S. Tabelle 9.

Edmondson, Giltner und Thom (1920, 42) konnten bei Cl. bot. Typ A durch die getrennte Injektion von $CaCl_2$-Lösung und sehr großen Sporenmengen Botulismus erzeugen.
In einem Versuch wurden 6 Mäusen in den linken Oberschenkel jeweils 4 Millionen entgiftete Botulinussporen injiziert, in den rechten Oberschenkel dagegen 0,1 ml einer sterilen 3%igen $CaCl_2$-Lösung. Keines der Tiere erkrankte an Botulismus.
Zum Vergleich wurden je 2 Mäuse auf dieselbe Art mit 320 000 Sporen von Cl. novyi und 460 000 Sporen von Cl. septicum infiziert. Bei sämtlichen Tieren entwickelte sich nach 2-3 Tagen an den geschädigten Oberschenkeln ein lokales Ödem, dem rasch die allgemeine Intoxikation und der Tod folgten.

2. Der kataphylaktische Einfluß von Adrenalin, Na_2CO_3, $CaCl_2$ und steriler Erde.

Tierversuch 11 S. Tabelle 10.

Junghans (1933, 68) konnte in einer Zusammenstellung von 60, im Anschluß an therapeutische Injektionen entstandenen Gasbrandfällen, häufig Koffein (18 mal), Adrenalin (6 mal), Chinin (5 mal), Kampfer und Morphium (je 3 Fälle) als infektionsbegünstigende Substanzen nachweisen.
Brocard (1940, 17) und Evans (1947, 44) bestätigten in Tierversuchen den begünstigenden Einfluß von Adrenalin auf künstliche Infektionen mit Cl. perfringens.
Im folgenden wurde geprüft, ob Adrenalin ebenfalls die Infektion mit entgifteten Sporen von Cl. bot. Typ B begünstigt. In einem Vergleich wurden außerdem der Einfluß von Na_2CO_3, $CaCl_2$ und feingeschlämmter Erde untersucht. Zusammen mit 0,1 ml einer in Zehnerpotenzen verdünnten Sporensuspension erhielten verschiedene Mäusegruppen jeweils 0,1 ml einer sterilen

a) 1:5000 Suprareninlösung,
b) 3%igen $CaCl_2$-Lösung,
c) 1 n Na_2CO_3-Lösung,
d) und einer Aufschwemmung feingeschlämmter steriler Erde.

Tabelle 9

Tierversuch 10

Die lokal getrennte Injektion von 0,1 ml 3%iger $CaCl_2$-Lösung und von entgifteten Sporen von Cl. bot. Typ B, Cl. novyi und Cl. septicum.

	Oberschenkel links Sporen in 0,1 ml	Oberschenkel rechts 0,1 ml 3% $CaCl_2$	Maus 1	Maus 2	Maus 3 - 6
Cl. bot. Typ B	4 Millionen	0,1	alle 6 Mäuse blieben am Leben		
Cl. novyi	320 000	0,1	+ 48^h	+ 48^h	
Cl. septicum	460 000	0,1	+ 72^h	+ 72^h	

Mit Cl. novyi und Cl. septicum wurden nur je 2 Mäuse infiziert.

Tabelle 10

Tierversuch 11

Der kataphylaktische Einfluß von Adrenalin, Na_2CO_3, $CaCl_2$ und steriler Erde, bei gleichzeitiger Injektion von Botulinussporen.

Verdünnung	Sporenzahl in 0,1 ml	Suprarenin 0,1 ml 1 : 5000 Maus 1	Suprarenin 0,1 ml 1 : 5000 Maus 2	0,1 ml 3 % $CaCl_2$ Maus 1	0,1 ml 3 % $CaCl_2$ Maus 2	1 n Na_2CO_3 Maus 1	1 n Na_2CO_3 Maus 2	fein geschlämmte sterile Erde Maus 1	fein geschlämmte sterile Erde Maus 2
0	16 Millionen	-	-	4 Tage + alle Organe	4 Tage + alle Organe	-	-	-	-
10^{-1}	1,6 Millionen	-	-	6 Tage (+) Milz Muskul.	-	-	-	-	-
10^{-2}	160 000	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-3}	16 000	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	1 600	-	-	6 Tage (+) Milz Muskul.	-	-	-	-	-
10^{-5}	160	-	-	-	-	-	-	-	-

Todesfälle nur bei Schädigung mit 3 % $CaCl_2$-Lösung.

\+ an Botulismus gestorben (+) mit schweren Botulismussymptomen getötet

Kontrolle: Überstand nicht erhitzt 0,5 ml i.p. Maus 1 + 24^h Maus 2 + 28^h

Der Vergleich der Substanzen zeigte, daß die Infektion allein durch die 3%ige $CaCl_2$-Lösung begünstigt wurde. Alle übrigen Substanzen waren wirkungslos.

3. Der kataphylaktische Einfluß steriler Erde in 3 ‰ -iger $CaCl_2$-Lösung

Tierversuch 12

Bullock und Cramer (1919, 22) waren der Ansicht, daß der infektionsfördernde Einfluß des Kalziumchlorids nicht allein auf der gewebeschädigenden Wirkung beruhe, sondern daß z.B. der Gehalt des Bodens an Kalziumionen bei stark verschmutzten Wunden eine begünstigende Rolle spiele.
Feine sterile Erde wurde in einer 3 % -igen Lösung aufgeschwemmt und mit entgifteten Sporensuspensionen verschiedener Dichte 12 Mäusen i.m. injiziert.

Im vorigen Versuch hatte die alleinige Verwendung von steriler Erde bei keinem der Tiere zu Botulismus geführt. Dagegen verursachte die Aufschwemmung der Erde in 3 ‰ -iger $CaCl_2$-Lösung den Tod von 3 Tieren.

Tabelle 11

Tierversuch 12

Der infektionsbegünstigende Einfluß von Erde in 3 ‰ -iger $CaCl_2$-Lösung.

Verdünnung	Sporen in 0,1 ml	sterile Erde in 3 ‰ $CaCl_2$-Lösung	Maus 1	Maus 2
0	20 Millionen	0,1	5 Tage + Muskulatur Leber, Milz	-
10^{-1}	2 Millionen	0,1	-	-
10^{-2}	200 000	0,1	7 Tage (+) Muskulatur Milz	-
10^{-3}	20 000	0,1	11 Tage (+) Milz Muskulatur	-
10^{-4}	2 000	0,1	-	-
10^{-5}	200	0,1	-	-
			Maus 1 + 20^h	Maus 2 + 20^h

Kontrolle: nicht erhitzter Kulturüberstand 0,5 ml i.p.
\+ an Botulismus gestorben (+) mit schweren Botulismussymptomen getötet.

4. Der kataphylaktische Einfluß aerober Mischinfizienten

Tierversuch 13/14

Bei der Untersuchung der in den vorhergehenden Versuchen tödlich infizierten Tiere wurde stets eine Mischinfektion mit aeroben Keimarten festgestellt. In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich dabei um Mikrokokken, Streptokokken und anhämolytische E. coli. Bei den an Botulismus verendeten Mäusen des Tierversuches 8 wurde als Mischinfizient stets Proteus morganii isoliert.

Da Wunden stets mit mehreren Keimarten infiziert sind, sollte geprüft werden, ob Mikrokokken, Streptokokken oder Colikeime eine Infektion mit Cl. bot. begünstigen. Zu diesem Zweck wurden eintägige Bouillonkulturen von hämolytischen E. coli, β-hämolytischen Streptokokken und Staph. aureus mit physiologischer NaCl. -Lösung so weit verdünnt, daß Suspensionen gleicher Dichte entstanden. Mit Hilfe der Thoma-Hellige-Zählkammer wurde die ungefähre Keimzahl / ml grob ermittelt. Durch weiteres Verdünnen der Suspensionen wurden schließlich Aufschwemmungen mit dem gewünschten Keimgehalt hergestellt.
Von den verschiedenen Keimaufschwemmungen wurden jeweils 0,1 ml zusammen mit 0,1 ml verschiedengradig verdünnter Sporensuspensionen zur i.m.-Infektion bei Mäusen verwendet.
Alle infizierten Mäuse blieben am Leben, während die Kontrolltiere nach i.p.-Injektion von 0,5 ml der unverdünnten Kulturen schon nach wenigen Stunden starben.

Kontrollen zu Tierversuch 13:

Unverdünnte Kultur 0,5 ml i.p.	Maus 1	Maus 2
Cl. bot. nicht erhitzt	+ 20^h	+ 20^h
Staph. aureus	+ 7^h	+ 7^h
E. coli	+ 7^h	+ 7^h
β-hämolytische Streptokokken	+ 7^h	+ 7^h

Tabelle 12

Tierversuch 13

Der Einfluß aerober Mischinfizienten auf eine Infektion mit entgifteten Botulinussporen.

Cl. bot. Typ B	Staph. aureus			E. coli (hämol.)			β-hämolyt. Streptokokken		
Sporen in 0,1 ml	Keime in 0,1 ml	Maus 1	Maus 2	Keime in 0,1 ml	Maus 1	Maus 2	Keime in 0,1 ml	Maus 1	Maus 2
720 000	250 000	-	-	200 000	-	-	200 000	-	-
720 000	25 000	-	-	20 000	-	-	20 000	-	-
72 000	250 000	-	-	200 000	-	-	200 000	-	-
72 000	25 000	-	-	20 000	-	-	20 000	-	-
7 200	250 000	-	-	200 000	-	-	200 000	-	-
7 200	25 000	-	-	20 000	-	-	20 000	-	-

Tierversuch 14

Vier Meerschweinchen, die mit Staph. aureus, hämolytischen E. coli und Cl. bot. Typ B infiziert wurden, blieben ebenfalls am Leben.

Tabelle 13

	Staph. aureus	Cl. bot. Typ B
	Keimzahl	injizierte Sporenzahl
Meerschweinchen 54	250 000	200 000
Meerschweinchen 55	250 000	2 000 000

	E. coli (haemol.)	Cl. bot. Typ B
	Keimzahl	injizierte Sporenzahl
Meerschweinchen 56	200 000	200 000
Meerschweinchen 57	200 000	2 000 000

IV. Die Infizierung einer künstlich gesetzten Wunde mit entgifteten Sporen von Cl. bot. Typ B.

Tierversuch 15

Als abschließender Versuch wurde die Pathogenität entgifteter Sporen von Cl. bot. Typ B durch Infizierung einer künstlich gesetzten Wunde, unter Nachahmung der bei Anaerobierinfektionen meist anzutreffenden Wundverhältnisse, untersucht.
Für diesen Zweck stand ein 2 1/2 Jahre alter Hammel zur Verfügung.
Das Tier wurde mit einer hohen Extraduralanästhesie (15 ml 1 % Xylocain) abgelegt. Zusätzlich wurde das geschorene, mit Seife gewaschene und jodierte Operationsgebiet im Bereich des M. biceps femoris der linken Seite mit 10 ml 1 % Xylocain infiltriert.
Nach dorsaler Verschiebung der Haut wurde ein ca. 7 cm langer Schnitt durch die Haut und die Faszien gelegt. Der freiliegende Muskel wurde mit der Schere stumpf durchtrennt. Durch wiederholtes Öffnen und Schließen der Schere und durch Quetschen der Muskulatur mit einer Pinzette wurde in der Tiefe eine taschenreiche Läsion gesetzt, wie sie ähnlich bei Pfählungsverletzungen entstehen mag. Nach Einbringen von 2 ml steriler Erde wurde der Muskel oberflächlich mit Knopfheften vernäht. Danach wurden in das zertrümmerte Gewebe 2 ml einer entgifteten Sporensuspension injiziert, die insgesamt 20 000 Botulinussporen enthielt. Darauf wurden die Faszie und die Haut mit einer Knopfnaht vernäht. Die geschlossene Wunde wurde mit Holzteer abgedeckt. Prophylaktisch wurden dem Hammel nach der Operation 10 000 I.A.E. Tetanusantitoxin subkutan verabreicht.

Krankheitsverlauf:

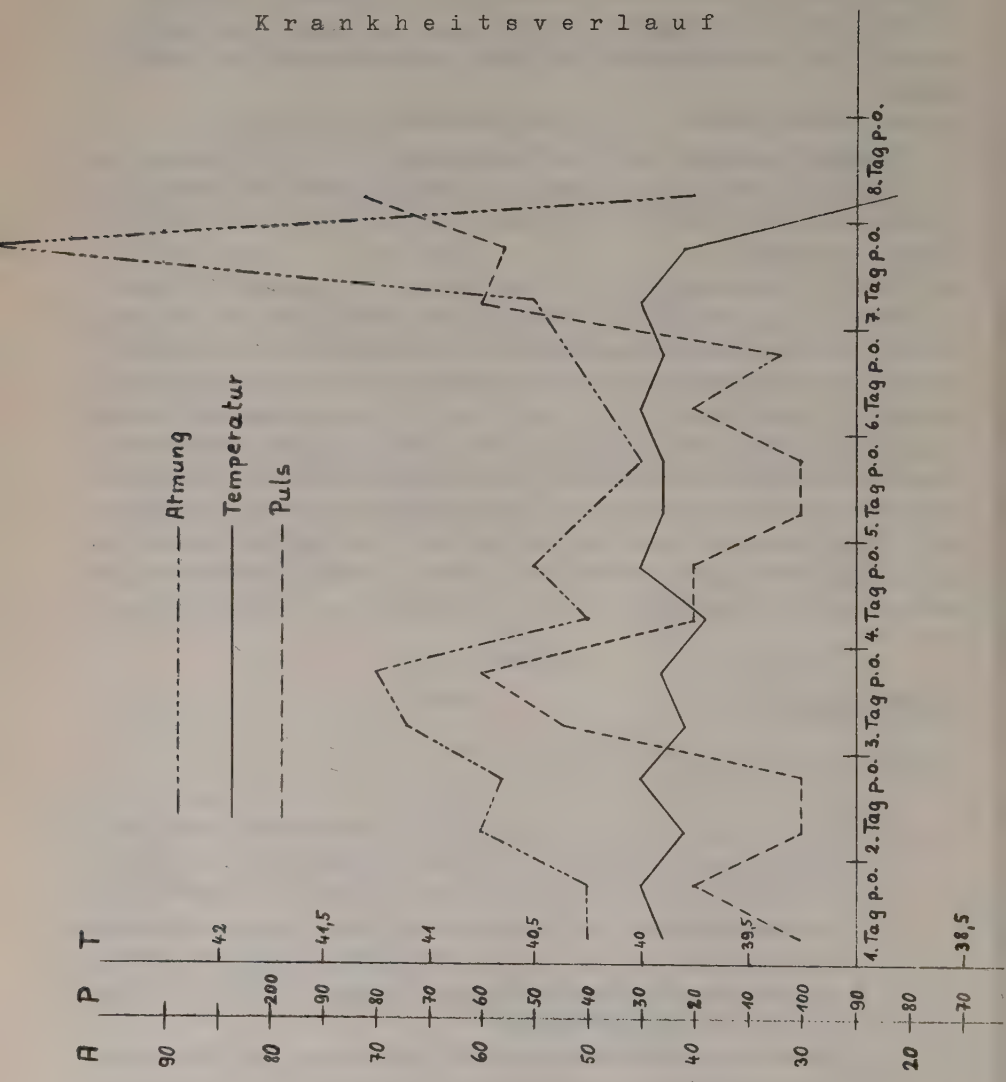
(siehe Tabelle 14, S. 54)

1. Tag p.o. Das Tier lahmte stark. Es belastete die schmerzende Gliedmaße nicht und lag die meiste Zeit. Das Operationsgebiet zeigte ein starkes Wundödem von der Größe zweier Handflächen. Der Hautschnitt war trocken verkrustet. Der Hammel zeigte guten Appetit und kaute wieder. Kot und Harnabsatz konnten beobachtet werden. Temperatur und Puls waren im normalen Bereich, dagegen war die Atemfrequenz erhöht (50 Atemzüge/Minute).
2. Tag p.o. Das Befinden unterschied sich nicht vom Vortag. Das Tier machte einen benommenen, teilnahmslosen Eindruck. Das Wundödem hatte

T a b e l l e 14

T i e r v e r s u c h 14

Hammel, 2 1/2 Jahre, mit 20 000 Botulinussporen künstlich infiziert.



sich stärker ausgedehnt. Die Atemfrequenz war leicht erhöht (60).

3. Tag p.o. Das Tier war noch teilnahmsloser als am Vortag. Es stützte im Liegen den Kopf auf der Nase auf. Puls und Atmung waren gegenüber dem Vortag erhöht (160 P, 80 A, Nüsternatmen). Das Wundödem war im Abklingen. Der Appetit war verringert, das Wiederkäuen normal (40 Kaubewegungen).

4. Tag p.o. Der Hammel machte einen lebhafteren Eindruck als an den Vortagen. Das Wundödem war weiter zurückgegangen.

5. Tag p.o. Ungestörtes Befinden. Die Extremität wurde wieder belastet.

6. Tag p.o. Ungestörtes Befinden. Heilung des Hautschnittes per primam.

7. Tag p.o. Der Hammel machte wieder einen benommenen Eindruck. Er lag sehr viel. Beim Auftreiben belastete er die Extremität nicht. Das Wundgebiet war sehr schmerzhaft. Dennoch nahm das Tier Futter auf. Beim Wiederkäuen wurden 86 Kaubewegungen gezählt. Der Ructus war ungestört.

Am Nachmittag kaute das Tier oft leer und knirschte mit den Zähnen. Im Maul befand sich zäher Schleim. An den Augen zeigte sich Ptosis und Tränenfluß. Beim Anrufen öffnete das Tier die Augen kurz, ließ aber die Lider gleich wieder sinken. Der Harn wurde häufig, in kleinen Portionen abgesetzt.

Am Abend lag das Tier in Seitenlage mit ausgestreckten Gliedern und zurückgelegtem Kopf da. Beim Aufrichten sank es in der Nachhand zusammen. Die Atmung war sehr stark erhöht (über 100). Deutliches Nüsternatmen. Es waren keine Pansenbewegungen und keine Darmgeräusche wahrnehmbar. Der Panseninhalt war weich. Um 21 Uhr war das Tier wieder in der Lage selbständig aufzustehen.

8. Tag p.o. Das Tier lag auf der Seite mit halbgeschlossenen Augen. Die Augenbewegungen waren unkoordiniert. Die Pupillen waren stark erweitert, die Kornea trocken.

Der Hammel speichelte stark. Er machte leere Kaubewegungen und knirschte mit den Zähnen. Die Atemfrequenz war wieder zu einem normalen Wert zurückgekehrt. Die Atemzüge erfolgten jedoch unregelmäßig und in ungleicher Intensität. Der Puls war erhöht (182/Min), die Körpertemperatur gegenüber den Vortagen um $1^{o}C$ unter $39^{o}C$ abgesunken.

Um 12 Uhr wurde das Tier in der Agonie entblutet und sofort seziert.

Pathologisch-anatomischer Befund:

Außer einem schwachen Lungenödem waren keine allgemeinen Veränderungen feststellbar.

Lokaler Befund:

Äußerlich konnten im Operationsgebiet außer der per primam verheilten Operationswunde keine Veränderungen festgestellt werden. Beim Einschneiden in die Tiefe der Muskulatur entwich geräuschvoll Gas. Es fand sich eine hühnereigroße Abszeßhöhle, die mit einer braunen, von feinen Bläschen durchsetzten Flüssigkeit erfüllt war. In der Höhle befand sich außerdem die in die Wunde mit eingenähte Erde. Die oberen, bei der Operation durchtrennten Muskelschichten waren durch ein blasses, feuchtes Narbengewebe vereinigt. Die Muskulatur war dunkelrot und fest. Einen Finger breit neben der hellgrauen Abszeßkapsel befand sich in der Muskulatur ein scharf demarkierter, hellrosafarbener, stark aufgelockerter Herd.
Der Popliteallymphknoten und der linke Darmbeinlymphknoten waren bis auf Walnußgröße markig geschwollen.

Histologisches Bild:

Die künstlich geschaffene, mit Erde verunreinigte Wundhöhle war von einem jungen Angiofibroblastengewebe umgeben. Es fanden sich zahlreiche Granulozyten und Makrophagen mit phagozytierter Erde. Das Angiofibroblastengewebe war mit diffusen Blutungen durchsetzt. Daneben fanden sich dystrophisch verkalkte Reste der Muskulatur. Peripher an das Angiofibroblastengewebe anschließend folgte eine chronische interstitielle Entzündung der Muskulatur. Diese ging einen Finger breit von der Abszeßhöhle entfernt diffus in eine gasige Phlegmone über. Es handelte sich also bei der makroskopisch erkennbaren, hellen Zone nicht um demarkierendes Gewebe.
In dem Bereich der Gasphlegmone fanden sich größere Hohlräume. Die Muskelschläuche waren zerrissen und zeigten das Bild der albuminoiden Degeneration mit Verlust der Querstreifung.
Das Interstitium war durch Ödemflüssigkeit verbreitert. Überall zeigten sich massenhaft Granulozyten mit vielfältigen Degenerationsformen (Karyorhexis, Karyopyknosis).

Bakteriologische Untersuchung:

In Ausstrichen aus der Abszeßhöhle und aus dem hellrosa gefärbten, aufgelocker-

ten Muskelgewebe konnte der Erreger direkt nachgewiesen werden. Im Nativpräparat bei Phasenkontrastbetrachtung zeigten sich neben Mikrokokken und Tetraden lebhaft bewegliche Stäbchen von Botulinusgröße. Vereinzelt waren lange, fadenförmige Verbände sichtbar. Die Stäbchen färbten sich grampositiv. Nach Raketteförbung wurden keine Sporen oder Sporenträger festgestellt. In giemsa-gefärbten Ausstrichen wurden massenhaft Leukozyten mit zahlreichen phagozytierten Stäbchen beobachtet.
Der kulturelle Erregernachweis gelang aus der Wunde, dem Popliteal- und Darmbeinlymphknoten und aus der Milz.
Die Diagnose wurde endgültig im komplizierten Tierversuch gesichert. Die aus den oben genannten Geweben isolierten Kulturen töteten 4 Mäuse innerhalb von 20 Stunden, während 2 mit typ- und stammspezifischen Anatoxin immunisierte Mäuse am Leben blieben.
Der direkte Toxinnachweis durch i.p. Injektion von je 0,5 ml Blutserum bei 4 Mäusen konnte nicht erbracht werden.

C. Besprechung der Ergebnisse

In den geschilderten Versuchen konnte die Zuverlässigkeit der Entgiftung durch Erhitzen ausreichend bewiesen werden (Tierversuch 4-14). Damit war die Grundlage für die Infektionsversuche gegeben.
Eine Entgiftung durch Waschen allein ist möglich (Tierversuch 1), bedarf jedoch aufwendiger Kontrollen im direkten Toxinversuch. Zudem birgt sie das Risiko der Toxinnachbildung in sich, selbst wenn die entgifteten, von allen Nährstoffen befreiten Keime bei $4^{o}C$ aufbewahrt werden (Tierversuch 2, 3).
Bei der Prüfung der Toxinnachbildung in einer durch Waschen entgifteten, jungen, unversporten Kultur (< 5 % Sporen) und in einer stark versporten Kultur (85 % Sporen), die bei $4^{o}C$ aufbewahrt wurden, zeigte sich trotz gleicher Keimdichte der Suspensionen eine viermal höhere Toxizität der jungen Kultur (Tierversuch 3). Daraus kann geschlossen werden, daß hauptsächlich vegetative Keime für die Toxinnachbildung in den betreffenden Kulturen verantwortlich sind. Diese Annahme findet in der Beobachtung Unterstützung, daß in durch Erhitzen entgifteten Kulturen, d.h. Kulturen, in denen neben der Zerstörung des Toxins die Abtötung vegetativer Keime erfolgte, in demselben Zeitraum keine Toxinnachbildung beobachtet wurde (Tierversuch 4).
Bei dem Versuch, die Entstehung des Toxins aus den vegetativen Keimen zu erklären, ist man geneigt, sich auf die Erkenntnis von N e l s o n (1927, 100),

Boroff (1955, 15), Kindler, Mager und Grossowicz (1955, 76), Bonventre und Kempe (1959, 14) u.a. zu stützen, die nachgewiesen haben, daß das Toxin durch Autolyse der Keime frei wird.

Die Autolyse wird durch eine Reihe fermentativer Abbauvorgänge verursacht. Es ist bekannt, daß fermentative Reaktionen direkt von der Temperatur abhängig sind, bei einer Temperatur von 4°C also viel langsamer ablaufen als bei höheren (das Ferment nicht schädigenden) Temperaturen. Nun wurde aber eine Kultur im Tierversuch sowohl sofort nach der Waschung (Tierversuch 1), als auch nach achtwöchiger Aufbewahrung bei 4°C geprüft (Tierversuch 2). Dabei zeigte sich, daß die sofort im Tierversuch geprüfte Kultur atoxisch war (TV 1), während die bei 4°C aufbewahrte Kultur nach 8 Wochen, unabhängig von der Zahl der vorausgegangenen Waschungen, wieder toxisch geworden war (TV 2).
Vorausgesetzt, daß das Toxin durch Autolyse, d.h. durch fermentative Vorgänge frei wird, müßte bei Verwendung gleicher Keimmengen, nach rein physikalisch-chemischer Betrachtungsweise, das Toxin bei 37°C bedeutend schneller freigesetzt werden als bei 4°C.
Dies war im Tierversuch jedoch nicht der Fall. Die Annahme, daß die vegetativen Keime bei 4°C geschädigt wurden und deshalb noch schneller den Abwehrkräften des Körpers erlagen als die frischgewaschenen Keime, d.h. noch schneller Toxin freisetzten als die letzteren, wird durch den gleichzeitigen Toxinnachweis in der keimfreien Waschflüssigkeit widerlegt.
Wäre in dem Versuch mit den frischgewaschenen Kulturen (Tierversuch 1) Toxin im Tierkörper durch den Zerfall der Keime freigeworden, so hätten sämtliche untersuchten Aufschwemmungen, unabhängig von der Zahl der Waschungen, toxisch sein müssen, d.h. eine Entgiftung durch Waschen wäre überhaupt nicht möglich gewesen.
Wie die mikroskopische Kontrolle der Peritonealflüssigkeit von infizierten Mäusen gezeigt hat, fallen vegetative Keime tatsächlich sehr rasch der Phagozytose zum Opfer (TV 1). Dennoch setzen sie kein Toxin frei. Aus allem vorangegangenen bleibt nur die Erklärung, daß die Lysis der Zellen im Tierkörper (in den Phagozyten) entweder ganz ohne Toxinbildung abläuft oder daß das freigesetzte Toxin fortlaufend zerstört wird.
Diese Hypothese steht jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen der Autoren, die mit hohen Mengen entgifteter Keime Botulismus auslösen konnten, ohne daß eine Auskeimung der injizierten Sporen oder ein aktives Wachstum der Keime festgestellt werden konnte.
Prévot und Brygoo (1950, 105) konnten aus jungen, gewaschenen Kulturen nach der Methode von Raynaud und Segond (1949, 110),

K e p p i e (1951, 74) durch mechanische Zertrümmerung gewaschener und erhitzter Sporen in vitro Toxin freisetzen. K e p p i e hat für einen Typ A-Stamm die Sporenzahl, aus der künstlich eine Mäuse-LD_{50} freigesetzt werden kann, mit 50 Millionen ermittelt. Er konnte außerdem bei Mäusen mit 20 Millionen entgifteten Sporen ohne Zusatz schädigender Substanzen regelmäßig Botulismus hervorrufen, ohne eine Auskeimung der Sporen im Tierkörper festzustellen. Für den Tod der Mäuse machte er intrazelluläres, durch den Zerfall der Sporen im Tierkörper freigewordenes Toxin verantwortlich.
In den eigenen Versuchen war dagegen die alleinige i.p. Injektion von 80-155 Millionen, 6-8 mal gewaschenen Botulinuskeimen (Tierversuch 1,3) und 44-130 Millionen erhitzten Sporen i.m. und i.p. (Tierversuch 4,5) für Mäuse völlig unschädlich.
Es kann nur vermutet werden, daß die unterschiedlichen Versuchsergebnisse durch die Verwendung verschiedener Toxintypen (K e p p i e verwendete 2 Typ A-Stämme) bedingt waren.
Bei den Entgiftungsversuchen durch Waschen fiel auf, daß die Keimsuspension erst nach der 6. Waschung toxinfrei wurde, während der zugehörige keimfreie Überstand schon nach der 5. Waschung giftfrei war (TV 1). Die Ursache für die höhere Toxizität liegt sicher in geringen, den Keimen anhaftenden Toxinresten begründet. Genauso wie die Freisetzung des Toxins durch Zerfall der Keime im Tierkörper, hätte sich ein infektiöser Einfluß der Keime unabhängig von der Zahl der Waschungen weiter bemerkbar machen müssen, da die, im Versuch giftfreien Aufschwemmungen, dieselbe Keimzahl besaßen, wie die toxisch befundenen, weniger oft gewaschenen Suspensionen.
Von Cl. tetani und den Gasödemerregern ist schon lange bekannt, daß sie nach der Entgiftung apathogen sind (V a i l l a r d und V i n c e n t (1891, 143), B u l l o c k und C r a m e r (1917-1919, 22), T e a l e und B a c h (1919-1920, 136) u.a.). So hat auch in eigenen Versuchen die Injektion entgifteter Sporen von Cl. novyi und Cl. septicum (65 Millionen) bei Mäusen trotz der Verwendung hoher Sporenzahlen und trotz erwiesener Keimfähigkeit des Infektionsmaterials bei keinem der Versuchstiere zum Tode geführt. Der Vergleich von Cl. bot. mit den genannten, unter geeigneten Umständen hochpathogenen Gasödemerregern läßt vermuten, daß man von falschen Voraussetzungen ausgeht, wenn man versucht, die Infektiosität von Cl. bot. durch die alleinige Verabreichung des entgifteten Erregers nachzuweisen (TV 5).
Die oben genannten Autoren haben bei ihren Versuchen erkannt, daß erst eine Alteration des infizierten Gewebes die Voraussetzungen für das Pathogenwerden der Erreger des Starrkrampfes und des Gasödems schafft. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse konnte C o l e m a n (1929, 28) zum ersten Mal den siche-

ren Beweis für die Infektiosität von Cl. bot. erbringen, indem er geringe Sporenzahlen in die formalingeschädigte Muskulatur von Meerschweinchen injizierte.
Von den verschiedenen kataphylaktischen Substanzen, deren Einfluß in der vorliegenden Arbeit geprüft wurde, zeigte sich allein die 3%ige $CaCl_2$-Lösung infektionsbegünstigend (Tierversuch 6, 7, 9, 11).
Adrenalin (Suprarenin), das durch die kurzzeitige Schaffung hypoxischer Bedingungen in den Geweben (E v a n s 1947 (44)) die Infektion mit verschiedenen Gasödemerregern begünstigt, war nicht in der Lage, eine Infektion mit Cl. bot. Typ B zu manifestieren (TV 11). Ebensowenig konnte Na_2CO_3 und die mechanische Schädigung der Muskulatur mit steriler Erde bei Mäusen die entgifteten Sporen im Gewebe zur Auskeimung bringen (TV 11).
Die infektionsbegünstigende Wirkung der Gewebeschädigung mit 3%iger $CaCl_2$-Lösung machte sich sowohl bei Mäusen (TV 6), als auch bei Meerschweinchen (TV 7) bemerkbar. Von 10 infizierten Meerschweinchen starben 9 innerhalb von 8 Tagen an Botulismus. Ein Tier, das mit 600 entgifteten Sporen infiziert worden war, blieb am Leben.
Die Resistenz der weißen Mäuse war bedeutend größer als die der Meerschweinchen. Von 18 infizierten Tieren starben nur 6 (TV 6).
Die Schädigung der Muskulatur mit 3%iger $CaCl_2$-Lösung war noch 24 Std. nach Verabreichung der entgifteten Botulinussporen wirksam, jedoch nur bei Mäusen, die mit großen Sporenmengen infiziert waren. Die Alteration des Gewebes 6 Std. nach der Sporeninjektion rief auch bei kleinen Sporenzahlen Botulismus hervor (TV 9).
Wurde das Gewebe 18 Tage nach einer Infektion mit 44 Millionen Botulinussporen geschädigt, so gelang es nicht mehr, die latente Infektion zu aktivieren. Dagegen konnten nach dieser Zeit die entgifteten Sporen von Cl. novyi und Cl. septicum noch aktiviert werden (TV 8).
Es gelang nicht, durch die lokal getrennte Injektion von Botulinussporen und $CaCl_2$ Botulismus zu erzeugen, während die Sporen von Cl. novyi und Cl. septicum bei lokal getrennter Verabreichung pathogen waren (TV 10). Aus den Versuchen ergibt sich, daß die Botulinussporen, wenn sie ungeschützt in das gesunde Gewebe injiziert werden, sehr bald entweder der zellulären Abwehr des Körpers zum Opfer fallen, oder über die Lymph- und Blutbahnen im ganzen Körper verteilt werden, so daß die lokale Schädigung wirkungslos bleibt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit E d m o n d s o n , G i l t n e r und T h o m (1920, 42) und C o l e m a n und M e y e r (1922, 29).
Der Vergleich von Cl. bot. mit Cl. septicum und Cl. novyi zeigt, daß letztere länger im Körper latent bleiben (TV 8, 10). Daß sie jedoch vom Ort der Injektion

verschleppt werden, beweisen die positiven Versuchsergebnisse bei örtlich getrennter Schädigung (TV 10).
Die gleichzeitige Injektion von steriler Erde und Botulinussporen konnte keinen Botulismus hervorrufen (TV 11). Wurde die sterile Erde statt in physiologischer NaCl-Lösung in 3 ‰ iger $CaCl_2$-Lösung aufgeschwemmt und zusammen mit entgifteten Botulinussporen injiziert, starben jedoch einzelne Mäuse an Botulismus. Da die 3 ‰ $CaCl_2$-Lösung im Gegensatz zur 3 % Lösung keine sichtbaren Gewebsveränderungen hervorrief, besteht die Möglichkeit, daß, wie schon Bullock und Cramer (1919, 22) vermuteten, neben der gewebeschädigenden Wirkung des $CaCl_2$ noch andere Faktoren wirksam werden, die eine Auskeimung im Tierkörper begünstigen.
Bei allen Versuchen fiel die ungleiche Verteilung der Todesfälle auf, sowohl in Bezug auf die Infektionsdosis, als auch im Hinblick auf das zeitliche Auftreten. So starb z.B. im Tierversuch 6 eine Maus an Botulismus, der nur 75 Sporen injiziert wurden, während eine Maus, der 7,5 Millionen Sporen verabreicht worden waren, am Leben blieb. In einem anderen Fall starb z.B. ein Meerschweinchen, das mit 600 Sporen infiziert wurde nach 70 Std. an Botulismus, während ein anderes Tier, dem 6 Millionen Sporen injiziert worden waren, erst nach 103 Std. der Infektion erlag (TV 7).
In den infizierten Geweben der an Botulismus gestorbenen Versuchstiere wurden neben Cl. bot. häufig aerobe Begleitkeime gefunden. Bei diesen handelte es sich meistens um anhämolytische Mikrokokken, Streptokokken und Colikeime. Versuche mit Staph. aureus, β-hämolytischen Streptokokken und hämolytischen E. coli, die einen möglichen begünstigenden Einfluß der angetroffenen Begleitflora nachweisen sollten, verliefen ergebnislos (TV 13,14).
Den sicheren Beweis für die Infektiosität entgifteter Sporen von Cl. bot. Typ B lieferte neben den, mit kleinen Sporenmengen verursachten Botulismusfällen bei Mäusen und Meerschweinchen, die Infizierung einer künstlich gesetzten, mit steriler Erde verunreinigten Muskelwunde bei einem Hammel (TV 15).
Selbst kleine Mengen entgifteter Sporen (bei Mäusen 75, bei Meerschweinchen 600, bei einem Hammel 20 000) können unter günstigen Verhältnissen im Tierkörper auskeimen, sich vermehren und Toxin bilden. Wie bei allen Clostridieninfektionen spielt die Schädigung des infizierten Gewebes eine ausschlaggebende Rolle bei der Entstehung der Infektion. In nekrotischem Gewebe finden die Sporen das für die Auskeimung und das Wachstum günstige Redoxpotential.
Die durch die Wirkung proteolytischer und saccharolytischer Fermente freiwerdenden Zerfallsprodukte und Gase führen in den benachbarten, gesunden Geweben zu Kreislaufschädigungen wie Thrombenbildungen, Gefäßspasmen und Diathesen (Zeissler, Krauspe, Rassfeld-Sternberg 1958 (156)). Dadurch findet das Wachstum weiteren Boden. Die außerordentlich hohe

Toxizität des Botulinusgiftes macht es unmöglich, experimentell einen direkten Einfluß des Toxins auf die Gewebe nachzuweisen. Schon nach kurzer Zeit wird in den Wunden genügend Toxin gebildet, um durch allgemeine Intoxikation den Tod der Tiere herbeizuführen. Dennoch werden bei den durch Infektion entstandenen Botulismusfällen deutliche lokale Veränderungen festgestellt. Das klare, gallertige, nicht hämorrhagische Ödem mit geringer Gasbildung gleicht sehr den durch Cl. novyi verursachten Veränderungen, wenn es auch bei weitem nicht deren Umfang annimmt.

Die bakteriologische Untersuchung der Organe ergab, daß bei Wundinfektionen der Erreger meist nur in dem infizierten Gewebe nachgewiesen werden konnte (Meerschweinchen). Bei den Mäusen konnte der Erreger dagegen regelmäßig auch aus der Milz isoliert werden. Bei der Untersuchung des an Botulismus gestorbenen Hammels waren außerdem die regionalen Lymphknoten mit Cl. bot. besiedelt.

Erfolgte die Sektion der Tiere erst mehrere Stunden nach dem Tod, konnte Cl. bot. dagegen regelmäßig in fast sämtlichen Organen nachgewiesen werden. Demnach ist die Isolierung des Erregers bei spät sezierten Tieren nicht für eine intravitale Besiedlung der Organe beweisend.

Bei dem ubiquitären Vorkommen des Erregers im Boden und angesichts seiner nachgewiesenen Infektiosität bleibt es weiterhin ungeklärt, weshalb nicht häufiger Wundinfektionen mit Cl. bot. beobachtet werden. Seit den Veröffentlichungen von Davis, Mattman und Wiley (34); Thomas, Kelleher und McKee (140) und Hampson (60) im Jahre 1951 wurden keine weiteren Botulismusfälle durch Wundinfektion bekannt.

Es ist anzunehmen, daß unter natürlichen Verhältnissen das Wachstum von Cl. bot. in Wunden durch verschiedene Einflüsse unterdrückt wird. Dabei steht der Verdacht einer ungünstigen Beeinflussung durch Begleitkeime im Vordergrund. Es ist bekannt, daß jede verschmutzte Wunde mit Gasödemerregern infiziert ist. Dennoch entwickelt sich nur sehr selten das Krankheitsbild des Gasödems. Seit seiner Entdeckung durch van Ermengem wurden Cl. bot. jahrzehntelang alle infektiösen Eigenschaften abgesprochen. Dadurch lassen sich vielleicht die seltenen Isolierungen des Keimes aus Wunden erklären, denn was man nicht sucht, findet man nicht. Vielleicht wurde in den vergangenen Jahren manche tödliche Wundinfektion mit Cl. bot. als Gasödem diagnostiziert. Dies mag umso leichter geschehen sein, als Monoinfektionen mit Clostridien äußerst selten sind. Immerhin gilt es, in Zukunft an die Möglichkeit einer Botulinusinfektion zu denken, besonders in akuten Fällen, bei denen neben dem Wundödem die Intoxikationserscheinungen im Vordergrund stehen, oder Fälle, wo sich die Verabreichung von Gasödemserum wirkungslos erweist.

Im Jahre 1956 ist der Fall eines Tierarztes bekannt geworden, bei dem sich im Anschluß an eine Verletzung mit einer Injektionskanüle Lähmungserscheinungen einstellten, die von dem behandelnden Arzt als Botulismus diagnostiziert wurden. Der Anspruch des Tierarztes, die Krankheit als Berufsunfall anzuerkennen, wurde von dem Gutachter abgelehnt (121, 1956). Ohne darüber urteilen zu wollen, ob es sich in dem betreffenden Fall um Botulismus handeln konnte oder nicht, muß doch Kritik an der Begründung des Gutachtens geübt werden, da in diesem die Möglichkeit einer Infektion mit Cl. bot. grundsätzlich verneint wird.

D. Zusammenfassung

1. Kulturen von Cl. bot. Typ B wurden durch halbstündiges Erhitzen auf 80°C völlig entgiftet. Während achtwöchiger Aufbewahrung der erhitzten Kulturen bei 4°C wurde kein Toxin nachgebildet.

2. Durch 6-8maliges Waschen (wiederholtes Zentrifugieren und Aufschwemmen in physiolog. NaCl-Lösung) konnten die Kulturen von Cl. bot. Typ B entgiftet werden.
   Während achtwöchiger Aufbewahrung der entgifteten Kulturen bei 4°C wurde unabhängig von der Zahl der vorausgegangenen Waschungen Toxin nachgebildet.
   In jungen unversporten Kulturen wurde mehr Toxin nachgebildet als in versporten Kulturen.

3. Die i.m. Injektion gewaschener und erhitzter Sporen von Cl. bot. Typ B, Cl. novyi und Cl. septicum war für Mäuse unschädlich, obwohl große Sporenmengen verwendet wurden (44 - 65 Millionen).

4. Nach Alteration des Gewebes durch 3%ige $CaCl_2$-Lösung konnte bei Mäusen mit 75, bei Meerschweinchen mit 600 Sporen Botulismus hervorgerufen werden.

5. Bei Mäusen konnte eine latente Infektion mit Botulinussporen durch nachträgliche Gewebeschädigung mit 3 % $CaCl_2$-Lösung aktiviert werden.
   Erfolgte die Schädigung mit $CaCl_2$ erst 24 Std. nach der Sporeninjektion, so starben nur die Mäuse an Botulismus, die mit hohen Sporen-

mengen infiziert worden waren. Die Schädigung nach 6 Std. ließ auch geringe Infektionsmengen wirksam werden (220 Sporen). Während entgiftete Sporen von Cl. septicum und Cl. novyi noch 18 Tage nach der Injektion durch $CaCl_2$ aktiviert werden konnten, blieb die Schädigung bei Mäusen, die mit Botulinussporen infiziert waren, wirkungslos.

6. Die örtlich getrennte Injektion von entgifteten Botulinussporen und 3 % $CaCl_2$-Lösung konnte bei Mäusen keinen Botulismus hervorrufen, während die Sporen von Cl. novyi und Cl. septicum unter denselben Voraussetzungen pathogen waren.

7. Adrenalin, Na_2CO_3 und sterile Erde übten bei Mäusen keinen infektionsbegünstigenden Einfluß auf die Sporen von Cl. bot. aus.

8. Bei einem Hammel führte die Infizierung einer künstlich gesetzten, mit steriler Erde verunreinigten Wunde mit 20 000 entgifteten Botulinussporen am 7. Tag zu Botulismus.

9. Bei den infizierten Tieren stand klinisch das Bild der Botulinusintoxikation im Vordergrund. In allen Fällen konnten jedoch lokale Veränderungen festgestellt werden, die pathologisch anatomisch dem durch Cl. novyi hervorgerufenen malignen Ödem glichen.

10. Cl. bot. konnte regelmäßig aus den veränderten Geweben isoliert werden. Mikroskopisch wurde der Beweis für ein vegetatives Wachstum des Erregers im Tierkörper erbracht. Eine intravitale Keimbesiedlung der inneren Organe findet nach den vorliegenden Untersuchungen nicht statt.

11. Die unter gleichartigen Bedingungen ausgeführten Infektionsversuche mit Cl. bot., Cl. novyi und Cl. septicum haben gezeigt, daß Cl. bot. unter ähnlichen Voraussetzungen wie die Erreger des malignen Ödems infektiöse Eigenschaften entfaltet. Abschließend werden die möglichen Gründe für das seltene Auftreten von Wundinfektionen mit Cl. bot. und für die seltenen Isolierungen des Erregers aus Wunden diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Abrams A., Kegeles G. und Hottle G.A. — The purification of toxin from Clostridium botulinum Type A. Am.J.Biol.Chem. 164, 63 (1946)

2. Altemeier, W.A. — Ref. nach Zeissler u. Mitarb. 156. Bd. 1, S. 36

3. Ambache N. — Peripheral action of botulinum toxin. Nature 161, 482 (1948)

" — The peripheral action of Cl. botulinum toxin. J.Physiol. 108, 127 (1949)

" — A further survey of the action of Clostridium botulinum toxin upon different types of autonomic nerve fibre. J. Physiol. 113, 1 (1951)

4. Appleton G.S. und White P.G. — Laboratory evaluation of a trivalent toxoid for botulism. Am. J. Vet. Res. 20, 170 (1959)

5. Armstrong C., Story R.V. und Scott E. — Botulism from eating canned ripe olives. Publ. Health Reports U.S.P.H. Wash. 34, 2877 (1919)

6. Barg Z. — Z. Mikrob. 4, 17 (1940) Ref. nach Prévot 104. S. 178

7. Bellinger H., Körnlein M., Lembke A. — Das Verhalten des Toxins von Cl. bot. und S. enteritidis gegenüber Chemotherapeutica, Antibiotika u. Farbstoffen. Zbl. Bakt. I Orig. 156, 430 (1950/51)

8. Bengtson I.A. — Preliminary note on a toxin producing anaerobe, isolated from larvae of the green fly. Publ. Health Rep. 37, 164 (1922 a)

" — Studies on organisms concerned as causative factors in botulism. U.S. Publ.Health Serv. Hyg.Lab.Bull. 136,7 Washington (1924)

9. Bennetts H.W. und Hall H.T.B. — Botulism of sheep and cattle in Western Australia: its cause and its prevention by immunization. Australian Vet. J. 14, 105 (1938)

10. Bergey — Manual of Determinative Bacteriology 7. Auflage, Baltimore 1957

11. Bishop G.H. und Bronfenbrenner J. — Amer. J. Physiol. 117, 393 (1936)

12. Bitter L. — Der Botulismus. Ergebnisse der allg. Pathologie und patholog. Anatomie 19, 762 (1921)

13. Blumberger K. und Gross H. — Beitrag zur Infektion mit Bac. bot. Dtsch.med.Wschr. 62, 1451 (1936)

14. Bonventre P.F. und Kempe L.L. — Physiology of toxin production by Cl. bot. Types A and B. II. Effect of carbohydrate source on growth, autolysis and toxin production. Appl. Microbiol. 7, 372 (1959)

" — III. Effect of pH and temperature during incubation on growth, autolysis and toxin production. ebenda Seite 374

15. Boroff D.A. — Study of toxins of Cl. bot. III. Relation of autolysis to toxin production. J. Bact. 70, 363 (1955)

16. Boroff D.A. und Cabeen H.D. — Studies of toxins of Cl. bot. II. Immunization of rabbits with an atoxic variant of Cl. bot. Type C. J. Bact. 67, 198 (1954)

17. Brocard H. — Production chez le cobaye de phlegmons gazeux mortels par l'injection simultanée d'adrénaline et de cultures de bacillus perfringens avirulent. C.r.Soc.Biol. 134, 567 (1940)

18. Bronfenbrenner J. und Schlesinger M.J. — Serologic method for detecting infection in foods. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 17, (1919)

Some of the factors contributing to toxicity of bot. toxin by mouth.

J.A.M.A. 78, 1519 (1922)

The effect of digestive juices on the potency of bot. toxin.

J.exp. med. 39, (1924)

19. Brooks V.B. — The action of botulinum toxin on motornerve filaments. J.Physiol. 123, 501 (1954)

20. Brygoo E.R. — Recherches sur l'hémolysine de Cl.bot.D. Ann. Inst. Pasteur 78, 795 (1950)

21. Buehler H.J., Schantz E.J. und Lamanna C. — The elemental and amino acid composition of crystalline Cl. bot. Type A toxin. J. Biol. Chem. 169, 295 (1947)

22. Bullock W.E. und Cramer W. — On a new factor in the mechanism of bacterial infection. Proc. Roy. Soc. London, Series B, 90, 513 (1917 - 19)

" — On the mechanism of bacterial infections with special reference to gas gangrene. Sixth Sc. Rep. Imp. Cancer Res. Fund. 23, (1919)

23. Burgen A.S.V., Dickens F. und Zatman L.J. — The action of bot. toxin on the neuromuscular junction. J. Physiol. 109, 10 (1949)

24. Burke G.S. — Notes on Bacillus bot. J. Bact. 4, 555 (1919 b)

" — Studies on the thermal death time of spores of Cl. bot. II. The differential staining of living and dead spores. J. inf. dis. 32, 433 (1923)

25. Burke V., Elder J.C. und Pischel D. — Treatment in botulism. Arch. Int. Med. 27, 265 (1921)

26. Cardella M.A., Fiock M.A. und Wright G.G. — Bacteriological Proc. 58, 78 (1958)

27. Church F.E. — Exper. effect of Bac. bot. toxin and cultures on guinea pigs. Wisc. Med. J. 22 (1923)

28. Coleman G.E. — Germination of spores of Bac. bot. in collodion sacs in abdomen of guinea pigs and rabbits. J. inf. dis. 33, 384 (1923)

28. Coleman G.E. — Intramuscular infection of guinea pigs with spores of Cl. bot. Amer. J. Hyg. 9, 47 (1929)

29. Coleman G.E. und Meyer K.F. — Some observations on the pathogenicity of Bac. bot. J. inf. dis. 31, 622 (1922)

30. Coleman I.W. — Studies on the oral toxicity of Cl. bot. toxin, Type A. Canad.J.Biochem.Physiol. 32, 27 (1954)

31. Committee on Classification of the Soc. of Am. Bacteriologists — J. Bact. 2, 514 (1917)

32. Cowdry E.V. und Nicholson F.M. — A histological study of the central nervous system in experimental bot. poisoning. J.exp.med. 39, 827 (1924)

33. Davies J.R., Morgan R.S., Wright E.A. und Wright G.P. — The results of direct injections of bot. toxin into the central nervous system of rabbits. J.Physiol. 120, 618 (1953)

34. Davis J.B., Mattman L.H. und Wiley M. — Cl. bot. in a fatal wound infection. J.A.M.A. 146, 646 (1951)

35. Dickson E.C. — Botulism, a clinical and experimental study. J.A.M.A. 71, (1918)

36. Dickson E.C. und Shevky R.J. — Botulism. Studies on the manner in which the toxin of Cl.bot. acts upon the body.I. The effect upon the autonomic nervous system.II.The effect upon the voluntary nervous system. I.J.exp.med.37, 711 (1923 a) II. ebenda 38, 327 (1923 b)

37. Dinter Z. und Kull K.E. — Über den Ausbruch des Bot. bei Fasanenküken. Nordisk. Vet.Med. 6, 866 (1954)

38. Dozier C.C. — Optimum and limiting hydrogen-ion concentrations for Bac.bot. and quantitative estimation of its growth. J.inf.dis. 35, 105 (1924)

39. Dubovsky B.J. und Meyer K.F. — An experimental study of the methods available for the enrichment, demonstration and isolation of Bac.bot. J.inf.dis. 51, 501 (1922)

40. Duff J.T., Wright G.G. und Yarinsky A. — Activation of Cl. bot. Type E toxin by trypsin. J.Bact. 72, 455 (1956)

41. Easton E.J. und Meyer K.F. — Occurence of Bac.bot. in human and animal excreta. J.inf.dis. 35, 207 (1924)

42. Edmondson R.B., Giltner L. und Thom C. — The possible pathogenicity of Bac.bot. Arch.Int.Med. 26, 357 (1920)

43. Ermengem van E. — Des intoxications alimentaires. Centralblatt f. Bakt.Orig. 20, 23 (1896)

" — Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. Ztschr. Hyg. 26, 1 (1897)

44. Evans D.G. — Anticollagenase in immunity to Cl.welchii Type A infection. Brit.J.Exp.Pathol. 28, 24 (1947)

45. Evans F.R. und Curran H.R. — The accelerating effect of sublethal heat on spore germination in mesophilic anaerobic bacteria. J.Bact. 46, 513 (1943)

46. Forssmann J. — Beiträge zur Kenntnis der Bakteriologie des Botulismus. Zbl. Bakt.I.Orig. 29, 541 (1901)

47. Francillon M. — Einfluß der aeroben Mischinfektion auf Entwicklung und Toxinbildung des Bac. bot. Arch. Hyg. 95, 121 (1925)

48. Geiger J.C. — The possible danger of absorption of toxins of Bac.bot. through fresh wounds and from mucous membrane. Amer.J.Publ.Health 14, 309 (1924)

49. Geiger J.C., Dickson E.C. und Meyer K.F. — The epidemiology of botulism. Treasury Dept.U.S.Publ.Health Service, Publ.Health Bull. 127, 1 (1922)

50. Geurden — Ref. nach Prévot 104 S. 211

51. Graham R. und Brueckner A.L. — The relation of Bac. bot. to forage poisoning or cerebrospinal meningitis in horses. Studies in forage poisoning. J. Bact. 4, 1 (1919)

52. Graham R. und Eriksen S. — Experimental botulism in dogs. J.inf.dis. 31, 402 (1922)

53. Grilichess R.K. — Zur Laboratoriumsdiagnose des Botulismus. Schweiz.Z.Path.Bakt.6, 203 (1943)

54. Grodko N.S. — Ref. nach Prévot 104 S. 169

55. Gunnison J.B., Cummings J.R. und Meyer K.F. — Cl. bot. Type E. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.35, 278 (1936)

56.	Guyton A.C. und McDonald M.A.	Physiology of botulinus toxin. Arch. Neurol. Psychiat. Chicago 57, 578 (1947)
57.	Hall I.C.	The occurrence of B. botulinus Types A and B in accidental wounds. J. Bact. 50, 213 (1945)
58.	Hall I.C. und Davis N.C.	The influence of calcium chloride upon experimental botulism. J. exp. med. 37, 585 (1923)
59.	Halliwell G.	The action of proteolytic enzymes on Cl. bot. Type A toxin. Biochem. J. 58, 4 (1954)
60.	Hampson C.R.	A case of probable botulism due to wound infection. J. Bact. 61, 647 (1951)
61.	Henry H.	Ref. nach Zeissler und Mitarbeitern 156, Bd. 1, S. 171
62.	Hinklemann A.J.	The pathogenicity of the Bac. bot. Med. J. and Record 126, 406 (1927)
63.	Hitzmann D.C., Halvorson H.C. und Ukita T.	Requirements for production and germination of spores of anaerobic bacteria. J. Bact. 74, 1 (1957)
64.	Holland	J. Bact. 5, 217 (1920)
65.	Hottle G.A. und Abrams A.	Detoxification of crystalline bot. Type A toxin. J. Immunol. 55, 183 (1947)
66.	Jordan E.O. und Dack G.M.	The effect of Cl. sporogenes on Cl. bot. J. inf. dis. 35, 576 (1924)

67. Jude A., Girard P. und Carrat P. — Action destructrice in vivo de certains agents chimiques sur les toxines botulique et tétanique. Compt.rend.Soc.biol. 143, 318 (1949)

68. Junghanns H. — Gasbrand durch Einspritzung von Arzneimitteln. Dtsch.med.Wschr. 850 (1933)

69. Kahn M.C. — Anaerobic spore bearing bacteria of the human intestine in health and in certain diseases. J.inf.dis. 35, 423 (1924)

70. Kalich J. — Zur Pathogenese des Tetanus unter Berücksichtigung der Begleitkeime. Zbl.f.Vet.Med. 4, 51 (1957)

" — Tetanus als lokale und allgemeine Infektion. ebenda Seite 415

" — Phagozytose von Tetanussporen. ebenda Seite 431

71. Kalmbach E.R. und Gunderson M.F. — U.S.Dept.Agr.Tech.Bull. 411 (1934)

72. Katić R.V. — Ergebnisse unserer Lab. Untersuchungen über die Pathogenesis des durch Cl.bot. (B) hervorgerufenen Botulismus. Wien.Klin.Wschr. 211 (1957)

73. Kempner W. — Weiterer Beitrag zur Lehre von der Fleischvergiftung. Das Antitoxin des Botulismus. Ztschr.f.Hyg. 26, 481 (1897)

74. Keppie J. — The pathogenicity of spores of Cl. bot. J. Hyg. (Cambridge) 49, 36 (1951)

75. Kerner J. — Neue Beobachtungen über die in Wttbg. so häufig vorfallenden tödlichen Vergiftungen durch den Genuß geräucherter Würste. Tübingen 1820, zit. n. Schübel K. 120

76. Kindler S.H., Mager J. und Grossowicz N. — Prod. of toxin by resting cells of Cl. parabot. Type A. Science 122, 926 (1955)

" — Toxin production by Cl. parabot. Type A. J. Gen. Microbiol. 15, 394 (1956 b)

77. Knight — Ref. nach Prévot 104, S. 167

78. Kudo J. — Exp. Forschungen über die Pathogenese des Botulismus. Japan. Exp. Med. 9, 373 (1931)

79. Lamanna C. — Hemagglutination by botulinal toxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 69, 332 (1948)

" — The most poisonous poison. Science 130, 763 (1959)

80. Lamanna C., McElroy O.E. und Eklund H.W. — The purification and crystallisation of Cl. bot. Type A toxin. Science 103, 613 (1946)

81. Landmann G. — Über die Ursache der Darmstädter Bohnenvergiftung. Hyg. Rsch. 14, 449 (1904)

82. Legroux M.R. und Jéramec C. — L'infection botulique du porc. Bull. Acad. Nat. Méd. 128, 404 (1944)

83. Legroux M.R., Levaditi J.C. und Jéramec C. — Le botulisme en France pendant l'occupation. Presse méd. 55, 109 (1947)

84. Leifson E. — Bacterial spores. J.Bact.: 21, 331 (1931)

85. Lodenkämper H. und Durchschlag G. — Über die Pathogenese der Symptomatologie des Botulismus. Ztschr. Hyg. 135, 439 (1952)

86. Lowenthal J.P. und Lamanna C. — Characterization of botulinal hemagglutination. Amer.J.Hyg. 57, 46 (1953)

87. Mager J., Kindler S.H. und Grossowicz N. — Nutritional studies with Cl. parabot. Type A. J.Gen.Microbiol.10, 130 (1954)

88. Mandia J.W. — Serological group II of the proteolytic Clostridia. J.Immunol. 67, 49 (1951)

89. Masland und Gammon — J.Pharm.Pharmacol. 97, 499 (1949)

90. May A.J. und Whaler B.C. — The absorption of Cl. bot. Type A toxin from the alimentary canal. Brit.J.Exp.Path. 39, 307 (1958)

91. Mc Clung L.S. — Studies on anaerobic bacteria. J.inf.dis. 60, 122 (1937)

92. McIntosh J. — Ref.nach Zeissler und Mitarb. 156, Bd. 1, S. 171

93. McLennan J.D. — Ref. nach Zeissler und Mitarb. 156, Bd. 1, S. 36

94. Méry — Bull. Acad.Vét.France 20, 28 (1947)

95.	Meyer K.F.	Botulismus. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Hrsg. Kolle, Kraus, Uhlenhuth. 3. Auflage, Bd. IV/2, 1269 (Jena u. Berlin - Wien 1928)
	"	Bull.W.H.O. 15, 281 (1956)
96.	Meyer K.F. und Dubovsky B.J.	a) The distribution of the spores of Bac. bot. in California. b) The distribution of the spores of Bac. bot. in the U.S. c) The occurrence of the spores of Bac.bot. in Belgium, Denmark, England, the Netherlands and Switzerland. J.inf.dis. 31, 541, 559, 600 (1922 a, b, c)
97.	Meyer K.F. und Eddie B.	Perspectives concerning botulism. Ztschr.Hyg. 133, 255 (1952)
98.	Meyer K.F. und Gunnison J.B.	Cl. bot. Type D sp. n. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 26, 88(1928)
99.	Moberg K.	15. Internat. Vet. Congr. Stockholm 1, 1 (1953)
100.	Nelson C.I.	The relationship between the intracellular globulin and the toxin of Cl. bot. J.inf.dis. 41, 9 (1927)
101.	Olsen A.M. und Scott W.J.	The enumeration of heated bacterial spores. I. Experiments with Cl. bot. and other species of Clostridia. Austral.J.Sci.Res.Ser.B. 3, 219 (1950)
102.	Orr P.F.	Some observations on the biological characteristics of Bac.bot. and its toxins. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 17, 47 (1919)

102. Orr, P.F. — The pathogenicity of Bac.bot. J.inf.dis. 30, 118 (1922)

103. Petersen P.C. — Botulismus i svine besaetning. (Bot. in einem Schweinebestand) Medlemsbl. danske Dyrlaegeforening 40, 69 (1957)

104. Prévot A.R. — Biologie des Maladies dues aux Anaérobies. Le Botulisme S. 159 Collection de l'Institut Pasteur. (Paris 1955)

105. Prévot A.R. und Brygoo E.R. — Etude de la première souche française de Cl. bot. D. Ann. Inst. Past. 78, 1037 (1950)

" — Recherches sur les communautés antigéniques entre les cinq toxines botuliniques. Ann. Inst.Past.84, 1037 (1953 a)

" — Nouvelles recherches sur le botulisme et ses cinq types toxiniques. Ann.Inst.Past.85, 544 (1953 b)

106. Prévot A.R. und Huet M. — Existence en France du botulisme humain d'origine pisciaire et de "Cl.bot." E. Bull.Acad.Nat.Méd. 135, 432 (1951)

107. Prévot A.R. und Rossi — Bull.Acad.Vét.France 21, 387 (1948)

108. Pulaski E.J., Meleney F.L., William L.C. Spaeth — Bacterial flora of acute traumatic und wounds Surg. Gyn.Obstetr. 72, 982 (1941)

109. Putnam F.W., Lamanna C. und Sharp D.C. — Molecular weight and homogenicity of crystalline Botulinus A toxin. J.Biol.Chem. 165, 735 (1946)

110.	Raynaud M. und Segond L.	Extraction des toxines botuliniques á partir des corps microbiens. Ann. Inst. Past. 77, 316 (1949)
111.	Records E. und Vawter L.R.	Ictero-haemoglobinuria in cattle. J. Amer. Vet. Med. Ass. 60, 155 (1921)
112.	Reynolds und Lichtenstein	Ref. nach Prévot 104, S. 164
113.	Römer P.	Ein Beitrag zur Ätiologie des Bot. Zbl. Bakt. I. Orig. 27, 857 (1900)
114.	Rössler und Brewer	J. Bact. 51, 571 (1946)
115.	Rustigian R. und Cipriani A.	Ref. nach Zeissler und Mitarb. 156 Bd. 1, S. 36
116.	Sacquépée E.	Ref. nach Zeissler und Mitarb. 156 Bd. 1, S. 171
117.	Schoenholz P. und Meyer K.F.	Studies on the serologic classification of Bac. bot. II. Agglutination. J. Immunol. 10, 1 (1925)
118.	Schoop G.	Über die Empfindlichkeit des Nerzes gegen Botulinusgift. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 45, 427 (1937)
119.	Schoop G. und Harms F.	Über Botulinustoxin. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 48, 755 (1935)
120.	Schübel K.	Über das Botulinustoxin. Arch. exp. Path. Pharmakol. 96, 193 (1923)
121.	Schulz-Utermöhl H.	Ref. nach Zeissler und Mitarb. 156 Bd. 1, S. 172

122. Schwedow L.M. — Die Toxinbildung im Verdauungskanal bei oraler Infektion mit dem Bot. Erreger Typ A. J. Mikrobiol.Epid.Immun. 31, 106 (1960)

123. Scott W.J. und Stewart D.F. — Austr. J. Appl.Sci. 1, 188 (1950)

124. Seddon H.R. — The specific identity of Bac. parabot. J.of comp. Pathol. 35, 275 (1922)

" — Botulism in cattle from eating rabbit carcasses. Agricult.Gaz.of New S.Wales (1926)

125. Seeber F. — Botulismus als Berufskrankheit? Ztschr.ärztl.Fortbildung 50, 731 (1956)

126. Sherman J.M., Stark C.N. und Stark P.W. — The destruction of bot. toxin by intestinal bacteria. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 24, 546 (1927)

127. Smith L. de Spain und George R.L. — Ref. nach Zeissler und Mitarb. 156 Bd. 1, S. 36

128. Starin W.A. und Dack G.M. — Agglutination studies of Cl.bot. J.inf.dis. 33, 169 (1923)

" — Pathogenicity of Cl. bot. J.inf.dis. 36, 383 (1925)

129. Sterne M. und Wentzel L.M. — XIV. Internat. Congress of Vet.Med. London (1949)

" — A new method for the large-scale production of high-titre Botulinum formol-toxoid, Types C und D. J.Immunol. 65, 175 (1950)

130. Stevenson J.W. — Am.J.Med.Sci. 235, 317 (1958)

131. Stevenson J.W., Helson V.A. und Reed G.B. — A casein digest medium for toxin production by Clostridium. Canad.J.Research Sect. 25 E 14, (1947)

132. Sugiyama H. — Studies on factors affecting the heat resistance of spores of Cl. bot. J.Bact. 62, 81 (1951)

133. Tanner F.W. und Dack G.M. — Clostridium botulinum. J.inf.dis. 31, 92 (1922)

134. Tanner F.W. und Oglesby E.W. — Food Research 1, 481 (1936)

135. Taylor W.I. — The effect of antibiotics on spores of Cl. septicum in vivo. Antibiotics and Chemotherapy 4, 673 (1954)

136. Teale F.H. und Bach E. — Studies in bacterial infection. III. The fate of washed spores on inoculation into animals with special reference to the nature of bacterial toxaemia. J.Pathol.Bact. 23, 315 (1919/20)

137. Theiler A. und Robinson E.M. — Der Botulismus der Haustiere. Ztschr. f. Infekt. Krht.d.Haustiere 31, 165 (1927)

138. Thesleff S. — Supersensivity of skeletal muscle produced by bot. toxin. J.Physiol.(London) 151, 598 (1960)

139. Thom C., Edmondson R.B. und Giltner L.T. — Botulism from canned asparagus. J.Amer.Med.Ass. 73, 907 (1919)

140. Thomas C.G., Keleher M.F. und McKee A.P. — Botulism a complication of Cl. bot. wound infection. A.M.A. Arch.Path. 51, 623 (1951)

141. Treadwell P.E. und Jann G.J. und Salle A.J. — Studies on factors affecting the rapid germination of spores of Cl. bot. J.Bact. 76, 549 (1958)

142. Tulloch W.J. — The part played by concomitant infection with anaerobic organisms (other than Bac. tetani) in the causation of tetanus. Brit.med.J. 1, 614 (1918)

143. Vaillard L. und Vincent H. — Contribution á l'étude du tétanos. Ann.Inst.Past. 5, 1 (1891)

144. Verge J. und Goret P. — Sur la pathogénie du botulisme. Bull.Soc.Sc. Vét. Lyon 49, 92 (1947)

145. Wagman J. — Isolation and sedimentation study of low molecular weight forms of Type A Botulinus toxin. Arch. Biochem.Biophys. 50, 104 (1954)

146. Weinberg M. und Séguin P. — Ref. nach Zeissler und Mitarb. 156 Bd. 1, S. 167

147. Wheeler M.W. und Humphreys E.M. — Isolation of Bac. bot. Type B from feces by use of blood agar plates in anaerobic jars. J.inf.dis. 35, 305 (1924)

148. Willems R. — Le botulisme du cheval en Belgique. Acta biol. Belg. 1, 353 (1941)

" — Rev.belge path. et méd.exper. 21, 256 (1951)

149. Williams und Blair — Ref. nach Prévot 104, S. 165

150. Wright G.G., Duff J.T., Fiock M.A., Devlin H.B., und Soderstrom R.L. — Studies on immunity to toxin of Cl.bot.V. Detoxification of purified Type A and B toxin, and the antigenicity of univalent and bivalent aluminium-phosphate adsorbed toxoids. J.Immunol. 84, 384 (1960)

151. Würcker K. — Über Anaerobiose, zwei Fäulniserreger und Bac. bot. Sitzungsbericht der physik. med. Sozietät in Erlangen 41, 209 (1909)

152. Wynne E.S. — Physiol. studies on spore formation in Cl.bot. J.inf.dis. 83, 243 (1948)

153. Wynne E.S. und Foster J.W. — Physiological studies on spore germination with special reference to Cl. bot. J.Bact. 55 , 61, 69, 331 (1948 a,b,c)

154. Wynne E.S. und Schmieding W.R., Daye D.T.jr. — A simplified medium for counting Cl. spores. Food Research 20, 9 (1955)

155. Zeissler J. — Anaerobenzüchtung. Handbuch der pathog. Mikroorganismen. Hrsg. Kolle, Kraus, Uhlenhuth. 3. Aufl. Bd. X, 35 (Jena und Berlin-Wien 1929)

156. Zeissler,J., Krauspe C. und Rassfeld-Sternberg L. — Die Gasödeme des Menschen. Bd. I-III (Darmstadt 1958-1960)

In der Originalarbeit, die in der Bibliothek der Tierärztlichen Fakultät der Universität München aufbewahrt wird, finden sich folgende Abbildungen:

1. Mit entgifteten Sporen von Cl. bot. Typ B infizierte Maus.
   Starkes Ödem der infizierten Extremität und der Bauchwand.

2. Zwei Ausstriche von Wundsekret einer mit Botulinussporen infizierten Maus. Giemsa 1000 x.
   Vegetative Formen von Cl. bot. in Phagozytose.

3. Schnitt durch die mit Botulinussporen infizierte Muskulatur eines Hammels. Makroskopisch.
   Gasig-phlegmonös veränderter Herd.

4. Zwei histologische Schnitte durch die mit Botulinussporen infizierte Muskulatur eines Hammels. H.E. 60 x und 150 x.
   Ödem des Interstitiums, Gasbildung, albuminoide Degeneration und Zerreißung der Muskelfasern. Starke zellige Infiltration.

Zum Abschluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Dr. R. V i e r l i n g für seine stets freundliche Unterstützung danken.

Ferner gebührt mein Dank den med. techn. Assistentinnen Fräulein G. Günther und Fräulein G. Härtl für ihre stete Hilfsbereitschaft.

L e b e n s l a u f

Am 2. Juli 1936 wurde ich, Martin Heinrich K l e y , als viertes Kind des damaligen Studienrates Albert Kley und seiner Ehefrau Heilwig, geb. Lensch, in Geislingen an der Steige geboren.

Nach meiner Volksschulzeit, vom Herbst 1942 bis Sommer 1946, besuchte ich die Oberschule (später Gymnasium) in Geislingen/Steige.

Im Sommer 1952 erhielt ich ein Stipendium als Gastschüler in Merrill, Wisconsin, USA. Im Herbst 1953 kehrte ich an meine frühere Schule zurück und legte dort im März 1955 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1955 war ich als Student der Naturwissenschaften an der Universität Freiburg i. Breisgau immatrikuliert. Im darauffolgenden Semester (WS 1955/56) wandte ich mich dem Studium der Tiermedizin an der Universität München zu.

Im Sommer 1957 legte ich das Physikum ab. Nach bestandener tierärztlicher Staatsprüfung im Sommer 1960 war ich als Veterinärpraktikant in Lonsee, Kr. Ulm/Donau tätig. Am 13. März 1961 erhielt ich die Approbation als Tierarzt. Seit Mai 1961 arbeitete ich am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München an der vorliegenden Dissertation.